



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA TUSCIA DI VITERBO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AMBIENTALI

**DOTTORATO DI RICERCA IN EVOLUZIONE BIOLOGICA E BIOCHIMICA
XXII CICLO**

(BIO/05)

**POTENZIALI VETTORI DI MALARIA IN MAREMMA:
UNO STUDIO MULTIDISCIPLINARE**

Coordinatore

Prof.ssa Laura Zucconi

Tutori

Prof.ssa Anna Maria Fausto

Dottorando

Dott. Marco Di Luca

Dott. Roberto Romi



TUSCIA UNIVERSITY

Viterbo, Italy

DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE (DISA)

PhD Course in

BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EVOLUTION

XXII CYCLE

(BIO/05)

POTENTIAL MALARIA VECTORS IN MAREMMA AREA:

A MULTIDISCIPLINARY STUDY

Coordinator

Prof. Laura Zucconi

Tutor

Prof. Anna Maria Fausto

PhD student

Dr. Marco Di Luca

Dott. Roberto Romi

INDICE

RIASSUNTO	1
PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO	13
INTRODUZIONE	15
Le malattie trasmesse da vettori	15
I cambiamenti climatici e le malattie trasmesse da vettori.....	15
Sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori.....	18
Le zanzare e la loro importanza sanitaria	20
La malaria	21
Rischio di emergenza e di riemergenza delle malattie trasmesse da zanzare in Italia	23
Quadro storico della malaria in Italia e in Toscana.....	24
Rischio di reintroduzione della malaria in Italia.....	26
MATERIALI E METODI	31
AREA DI STUDIO	31
Caratteristiche del territorio	32
Il clima	38
Siti di campionamento	43
ATTIVITÀ DI CAMPO.....	45
Metodi di cattura	46
Conservazione dei campioni.....	46
ANALISI STATISTICA	46
ATTIVITA' DI LABORATORIO	47
Identificazione morfologica e molecolare.....	47

Analisi delle preferenze alimentari	47
Caratterizzazione ultrastrutturale di annessi dell'apparato riproduttore femminile ...	50
VALUTAZIONE DEGLI INDICI EPIDEMIOLOGICI	51
MODELLI STATISTICI E ANALISI DI TIPO GIS	51
Mappa di rischio statico.....	52
Modelli statistici categoriali di presenza/assenza e modelli protipali di dinamica.....	56
RISULTATI	59
PRIMA INDAGINE ENTOMOLOGICA	59
SECONDA INDAGINE ENTOMOLOGICA	60
INDAGINI ENTOMOLOGICHE SPORADICHE.....	69
TASSO DI PARITÀ	71
ATTIVITÀ TROFICA E PREFERENZE ALIMENTARI.....	71
CALCOLO DELLA CAPACITÀ VETTRICE.....	75
ANALISI ULTRASTRUTTURALE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE ...	76
REALIZZAZIONE DI MAPPE DI RISCHIO.....	82
REALIZZAZIONE DI MODELLI STATISTICI	87
DISCUSSIONE	95
CONCLUSIONI	101
BIBLIOGRAFIA	103
RINGRAZIAMENTI	112
ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE.....	113

POTENZIALI VETTORI DI MALARIA IN MAREMMA: UNO STUDIO MULTIDISCIPLINARE

RIASSUNTO

Negli ultimi anni in Europa sono state introdotte o reintrodotte alcune malattie trasmesse dalle zanzare, tra cui la malaria. I cambiamenti climatici e ambientali, spesso indotti dalle attività umane, sono stati riconosciuti come i principali fattori che potrebbero influenzare la distribuzione e la diffusione dei vettori che trasmettono queste malattie.

Alla luce del presunto riscaldamento globale e della possibile diffusione di agenti patogeni e vettori, è stato condotto uno studio multidisciplinare sulla possibilità di reintroduzione della malaria in certe aree a rischio dell'Italia. A questo scopo è stata scelta, come area di studio, la Maremma, una stretta fascia costiera pianeggiante in cui la malaria era iperendemica fino agli inizi degli anni '50. Questi livelli di iperendemia erano mantenuti da *Anopheles labranchiae*, il vettore più competente tra le specie del complesso *Anopheles maculipennis* e ancora presente nella regione. Inoltre nel 1997, in una zona rurale del grossetano, si è verificato un caso di malaria autoctona da *Plasmodium vivax*, presumibilmente trasmesso da popolazioni locali di *An. labranchiae* [1], dimostrando come la Maremma sia un'area a rischio di reintroduzione della malaria.

Scopo di questo studio è stato quello di:

- caratterizzare la fauna dei Culicidi in quest'area, vista la mancanza di dati faunistici ed ecologici in molte aree del Centro Italia;
- descrivere la distribuzione spaziale di *An. labranchiae* e valutare come i fattori ambientali e climatici possano influenzare la sua presenza nella Maremma, utilizzando tecnologie di tipo GIS;
- valutare le dinamiche di popolazione di *An. labranchiae* e fare previsioni di abbondanza basate sulle variazioni di fattori climatici, attraverso lo sviluppo di un modello statistico in grado di correlare dati entomologici con specifiche variabili climatiche, precedentemente selezionate;
- descrivere alcune caratteristiche ecologiche e biologiche di *An. labranchiae*, quali l'antropofilia/zoofilia e il periodo di attività trofica, fattori importanti nella valutazione della Capacità Vettrice. In questo studio si è caratterizzato, inoltre, a livello ultrastrutturale, l'apparato riproduttore femminile in tre specie anofeliche, utilizzando la microscopia ottica (LM) e quella elettronica a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM);
- calcolare alcuni indici epidemiologici, confrontando i risultati ottenuti con la letteratura esistente [2,3], quali il **Potenziale Malariogenico** dell'area di studio (cioè il rischio di reintroduzione della

malaria in quell'area) e i tre parametri che lo definiscono (**Recettività**, **Infettabilità** e **Vulnerabilità**), e la **Capacità Vettrice** (VC) di *An. labranchiae*.

Materiali e Metodi

L'area di studio è la Maremma, una regione geografica a cavallo tra Toscana e Lazio, che si estende dal Mar Tirreno alla zona collinare interna e che comprende una stretta pianura costiera. In questa area l'antico vettore di malaria, *An. labranchiae*, è ancora diffuso a densità epidemiologicamente rilevanti grazie alla presenza di una moltitudine di habitat naturali (zone umide, paludi e stagni) e ambienti modificati dall'uomo (risaie, canali di irrigazione e di drenaggio), che forniscono idonei focolai larvali alla riproduzione della specie.

Le zanzare sono state raccolte durante indagini stagionali e durante *survey* sporadici condotti, in siti selezionati, durante il periodo 2005-2009. Le zanzare sono state catturate in ambienti *indoor* (ricoveri animali e locali frequentati dall'uomo) e durante catture notturne "su uomo". Sono stati raccolti e analizzati quei parametri climatici che potessero influenzare la dinamica stagionale delle zanzare. Un campione rappresentativo di alate, per ciascun sito e per ogni anno, è stato identificato in laboratorio attraverso la morfologia delle uova e utilizzando una Multiplex-PCR.

Inoltre sono stati raccolti i dati storici di distribuzione e abbondanza delle specie anofeliche presenti in Maremma e di incidenza della malaria, oltre ai dati aggiornati dei casi di malaria importata e dei portatori di gametociti. La formula di MacDonald ha permesso di calcolare i valori teorici di capacità vettoriale di *An. labranchiae* (per sito e per mese).

L'apparato riproduttore femminile di *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. labranchiae* e *Anopheles stephensi* è stato analizzato e confrontato dal punto di vista ultrastrutturale, utilizzando LM, SEM e TEM.

Analisi geostatistiche, in cui sono state applicate tecnologie GIS, sono state condotte per individuare i potenziali focolai larvali e per valutare l'abbondanza degli adulti di *An. labranchiae*, utilizzando come livelli informativi le carte di uso del suolo, il reticolo idrografico e la distribuzione delle aziende zootecniche. Sono state quindi elaborate mappe di distribuzione spaziale delle larve e di presenza degli adulti secondo la metodica di Tran e collaboratori [4]. Inoltre un modello statistico multicategoriale di regressione logistica, basato su "predittori" climatici, è stato sviluppato per descrivere le fluttuazioni stagionali di *An. labranchiae* nei principali siti selezionati.

Risultati

Sono state raccolte 9.629 zanzare appartenenti a 17 specie. Tra queste zanzare, 9.364 (97,2%) sono esemplari appartenenti al complesso *An. maculipennis*; un campione di 2.230 alate (23,8%) è stato identificato morfologicamente e molecularmente.

I risultati evidenziano che *An. labranchiae* è la specie più abbondante lungo tutta la pianura costiera della Maremma e le sue fluttuazioni stagionali sono diverse in ciascun sito. Tuttavia questa specie è stata identificata anche in aree interne della Toscana, Umbria e Lazio. Nel biennio 2005-2006, la specie è stata trovata in provincia di Siena (in Val di Merse) e in provincia di Grosseto (Cinigiano e Casenovole), nel 2007, in tre siti della provincia di Viterbo e, nel 2008, in altro sito in Umbria, nei pressi della città di Narni (TR), confermando il primo ritrovamento di *An. labranchiae*, nel 2003, in provincia di Terni (Alviano e Fabro) [5]. Dalle indagini entomologiche e dall'elaborazione della mappa di distribuzione è stata stimata, nell'area di studio, un'elevata **Recettività** per *An. labranchiae*, parametro che indica la presenza e la densità del vettore. Gli alti valori di densità, rilevati in alcuni siti, sono strettamente legati alla presenza dei focolai larvali maggiormente produttivi (risaie e paludi) e alla presenza di aziende zootecniche. Inoltre l'elaborazione di un modello statistico multicategoriale ha permesso di analizzare e descrivere quei fattori ambientali che determinano le fluttuazioni stagionali della specie. Per stimare il rischio di trasmissione malarica è stato preso in considerazione un altro parametro entomologico, la **Capacità Vettrice** (VC), che esprime il numero medio di punture potenzialmente infettanti che possono originare in un giorno da un soggetto portatore di gametociti, capace di infettare tutte le zanzare sensibili che compiano su di esso un pasto di sangue. La VC dipende da tre fattori, l'antropofilia, la longevità e la densità del vettore. In una vasta zona di coltivazione del riso (sito 9), valori di VC sono risultati molto bassi nel mese di giugno, non costituendo quindi alcun rischio reale di trasmissione della malaria ($<0,01$ sia per *Plasmodium falciparum* che per *P. vivax*). Nel mese di luglio, i valori di VC erano alti (da 5 a 10 per entrambi i plasmodi), e nel mese di agosto erano compresi tra 2 e 4 per *P. falciparum* e 3 e 5 per *P. vivax*. Nella stessa provincia, ma in una zona dove sono segnalati solo i focolai naturali (sito 10), la VC in agosto variava tra 0,8 e 2 per *P. falciparum* e 0,9 e 3 per *P. vivax*. Gli altri due indici epidemiologici che, insieme alla Recettività, definiscono il **Potenziale Malariogenico** sono: l'**Infettabilità**, che rappresenta il grado di suscettibilità delle zanzare ai diversi ceppi di plasmodio, e la **Vulnerabilità** dell'area, che dipende dal numero dei portatori di gametociti nel periodo favorevole alla trasmissione della malaria. In Maremma l'Infettabilità di *An. labranchiae* è nota per *P. vivax* [1], mentre sembra che vi sia una scarsa competenza a trasmettere ceppi afro-tropicali di *P. falciparum* (ceppo di laboratorio NF54) [6]. E' confermata una

vulnerabilità molto bassa per l'area di studio dovuta alla scarsa presenza di portatori di gametociti presenti durante la stagione favorevole alla trasmissione.

In questo studio è stata effettuata l'analisi dei pasti di sangue per identificare l'ospite su cui si nutrono le specie anofeliche. Dapprima è stato utilizzato il metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), ma successivamente è stata sviluppata e messa a punto una nuova tecnica molecolare, una Multiplex-PCR. Questa, rispetto alla tecnica precedente, consente di identificare una gamma più ampia di ospiti vertebrati (13 specie) dall'analisi del contenuto stomacale di zanzare replete. L'analisi ha evidenziato che *An. labranchiae* punge una vasta gamma di ospiti, soprattutto grandi mammiferi (bovini, ovini, suini, cavalli), ma anche polli. Solo quattro *An. labranchiae* su 282 si sono nutrite sull'uomo. La maggior parte delle conoscenze relative all'ultrastruttura dell'apparato genitale femminile delle zanzare si basa su studi fatti sul genere *Aedes*, mentre poco si sa delle *Anopheles* che sembrano differenziarsi notevolmente dal congenere. A questo scopo è stato studiato, per la prima volta, il sistema riproduttivo femminile nelle *Anopheles*, e in particolare la spermateca e la ghiandola accessoria di *An. maculipennis s.s.*, *An. labranchiae* e *An. stephensi*, evidenziando correlazioni morfologiche e meccanismi fisiologici. È stato inoltre analizzato l'effetto del pasto di sangue sulle dimensioni della ghiandola accessoria di *An. labranchiae*, durante il ciclo gonotrofico.

Discussione

Come previsto, *An. labranchiae* è la specie predominante lungo la pianura costiera della Maremma, mentre *An. maculipennis s.s.* raggiunge alte densità nell'entroterra (sopra i 300 m s.l.m.). Tuttavia, l'areale di distribuzione di *An. labranchiae* probabilmente si sta estendendo verso nord e verso est, attraverso le colline interne del Centro Italia, dove in passato, i bassi livelli di trasmissione della malaria erano attribuiti ad *Anopheles atroparvus* e/o *Anopheles messeae*. Ad oggi è molto difficile stabilire se questi reperti siano il risultato di una nuova, ma lenta espansione di *An. labranchiae* in queste aree interne (dopo la campagna di eradicazione della malaria), o se, più semplicemente, la sua presenza non sia mai stata rilevata in passato a causa dell'ambiguità della diagnosi morfologica delle uova che non ha permesso di discriminare questo vettore dalle altre due specie gemelle, quando presenti in simpatia [7].

La distribuzione e l'abbondanza di *An. labranchiae* indicano una Recettività elevata dell'area di studio: questa specie è presente a densità diverse a seconda dei fattori climatici, ma anche delle attività antropiche che possono determinare la colonizzazione e la riproduzione massiva della specie, modificando l'ambiente naturale (ad es. con la presenza di risaie). Questo deve indurre a ritenere che lo sviluppo di modelli statistici e mappe di distribuzione spaziale dei vettori della

malaria siano prerequisiti essenziali per la valutazione del possibile rischio di ri-emergenza della malaria in Italia e per pianificare strategie di controllo adeguate. I valori di VC di *An. labranchiae* risultano molto elevati, soprattutto in quelle aree dove l'alta densità del vettore dipende dalla presenza delle culture risicole. Tuttavia la CV resta una misura puramente teorica, in quanto viene ottenuta attraverso la raccolta di zanzare su persone che si espongono all'attacco delle zanzare, senza la minima protezione. Mentre la competenza di *An. labranchiae* per ceppi esotici di *P. vivax* è stata dimostrata in Maremma [1], recenti esperimenti di infezione mostrano una suscettibilità molto bassa di questo vettore ai ceppi afro-tropicali di *P. falciparum*, almeno in condizioni di laboratorio [6].

Dal 2000, in Italia viene confermata una diminuzione costante dei casi di malaria importata; in particolare nell'area di studio, i casi importati nelle province di Grosseto e Siena hanno rappresentato il 10% dei casi della Toscana (6% dei casi nazionali). Gli immigrati provengono soprattutto dai paesi dell'Est Europa e dal Nord-Africa.

L'attività trofica di *An. labranchiae* si esplica dal crepuscolo fino alle prime ore notturne, ma concentrata soprattutto nelle prime ore dopo il tramonto. *An. labranchiae*, come atteso, risulta molto aggressiva durante le catture su uomo, confermando l'elevato grado antropofilia di questa specie rispetto alle altre del complesso *An. maculipennis*. L'analisi delle preferenze alimentari di *An. labranchiae* suggerisce che la scelta di questa specie per l'ospite è legata più alla disponibilità dell'animale che alla sua specifica attrazione; ciò sembrerebbe confermato anche dal basso numero di pasti di sangue su uomo, per la difficoltà di questa specie ad accedere alle abitazioni.

Il presente studio ha anche fornito la prima descrizione dettagliata della spermateca e della ghiandola accessoria in tre specie (*An. maculipennis* s.s., *An. labranchiae* e *An. stephensi*), chiarendo la morfologia dell'epitelio ghiandolare e cercando il significato funzionale del processo di secrezione nella biologia riproduttiva delle anofeline.

Conclusione

Nell'area di studio il Potenziale Malariogenico appare basso come in altre zone del paese in cui *An. labranchiae* ancora è presente a densità rilevanti; quindi un ritorno a una situazione endemica della malaria non sembra possibile (anche per il miglioramento delle condizioni socio-economiche e culturali). Tuttavia, il verificarsi di casi isolati appare un evento improbabile, ma non impossibile, come già avvenuto in quest'area nel 1997. In realtà è possibile che gli immigrati clandestini che vengono in Italia come lavoratori stagionali da paesi ad endemia malarica, rifiutando di accedere alle strutture sanitarie pubbliche, possano introdurre gametociti in zone rurali a rischio. Va inoltre

considerato che in estate i turisti, molto numerosi nella zona, potrebbero essere esposti a punture di zanzare più dei residenti.

La Maremma comunque rappresenta un modello di studio idoneo per l'analisi epidemiologica ed entomologica del rischio di reintroduzione della malaria. Per fattori genetici, storici, sociali ed epidemiologici, *An. labranchiae* è, infatti, l'unica specie che può davvero rappresentare un potenziale rischio di ri-emergenza della malaria per quei paesi che si affacciano sul versante occidentale del bacino del Mediterraneo. Per questo motivo, la sorveglianza epidemiologica ed entomologica deve continuare, soprattutto lungo la pianura costiera della Maremma, dove le densità rilevanti di *An. labranchiae* rappresentano ancora motivo di preoccupazione per la possibile ricomparsa della malaria in Italia.

Parole chiave: Maremma, malaria, *Anopheles labranchiae*, vettore, mappa di distribuzione, spermateca, ghiandola accessoria femminile, Potenziale malariogenico, Capacità Vettrice

- 1) Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna P, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M. Introduced malaria in Maremma, Italy, decades after eradication. *The Lancet*, 1998;351:1246-1248.
- 2) Romi, R, Pierdominici, G, Severini, C, Tamburro, A, Cocchi, M, Menichetti, D, Pili, E, Marchi, A. Status of malaria vectors in Italy. *J Med Entomol* 1997, 34(3):263-271.
- 3) Romi, R, Sabatinelli, G, Majori, G. Could Malaria Reappear in Italy? *Emerg Infect Dis* 2001, 7(6):915-919.
- 4) Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, De La Rocque S, Fontenille D, Baldet T. (2008). Using remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) a potential malaria vector in Southern France. *International Journal Of Health Geographics* 7:9.
- 5) Boccolini D, Di Luca M, Romi R. (2004). Preliminary findings on the distribution of the malaria vector *Anopheles labranchiae* in central Italy inferred by ITS2 analysis. XXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Vietri sul Mare (SA), 9-12 giugno. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1): 206.
- 6) Boccolini D, Di Luca M, Toma L, Severini F, VanGemert G, Mancini Barbieri F, Massa A, Luty A, Romi R. Feeding preferences and vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Tuscany), a former hyperendemic area in Central Italy. *Parassitologia*, 2008; 50 (1-2): 137.
- 7) Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Mancini Barbieri F, Massa A, Romi R. A 2-year entomological study of potential malaria vectors in Central Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2009, 9(6): 703-711.

POTENTIAL MALARIA VECTORS IN MAREMMA AREA: A MULTIDISCIPLINARY STUDY

ABSTRACT

In the last years, in some European Countries the introduction/re-introduction of some Mosquito-Borne Diseases, including malaria, occurred. Climate and environmental changes induced by human activities have been recognised as the major factors that could influence arthropod range distribution and the diffusion of these diseases.

In the light of the expected global warming and of the potential spread of exotic pathogens and vectors outside their natural areas, a multidisciplinary-study on the possibility that malaria could be reintroduced in Italy, in at “risk area”, was carried out. The Maremma region, a narrow coastal plain hyperendemic for malaria up to early 1950’s, was selected. Here, hyperendemic levels of the disease were maintained by *Anopheles labranchiae*, the more competent vector species of the *Anopheles maculipennis* complex, still present in the region. Moreover, in this area an autochthonous-introduced *Plasmodium vivax* case, reasonably transmitted by indigenous *An. labranchiae*, occurred in a rural locality of Grosseto in 1997 [1], demonstrating that Maremma is still a suitable area for malaria reintroduction.

This study aimed:

- ◆ to characterize the mosquito fauna in order to bridge a gap in faunistic and ecological data in Central Italy;
- ◆ to characterize the spatial distribution of *An. labranchiae* and to assess how the environmental and climatic factors may influence its occurrence in Maremma Plain, by using remote sensing techniques;
- ◆ to explain the *An. labranchiae* population dynamics and to forecast their densities according to climate changes, by developing a statistical model able to correlate entomological field data with several selected climatic variables;
- ◆ to describe some ecological and biological features of *An. labranchiae*:
 - the feeding preference and the trophic activity on humans, as important elements in the assessment of its Vectorial Capacity and its role in the malaria transmission;
 - the anopheline female reproductive system at ultrastructure level by using of light microscopy (LM), scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM);

- ◆ to evaluate the epidemiological malaria indexes, comparing the results with the existing literature [2,3]: the **Malariogenic Potential** of the study area (i.e. the risk of malaria reintroduction), by the assessment of the 3 parameters that define it (**Receptivity, Infectivity and Vulnerability**) and the **Vectorial Capacity** (VC) of *An. labranchiae*.

Material and Methods

The study area is the geographical region named “Maremma”, extending from Tyrrhenian Sea to the internal hilly area and including a narrow coastal plain between Tuscany and Lazio regions.

Here, epidemiologically relevant densities of the former malaria vector, *An. labranchiae*, are still observed due to a wide variety of natural habitats (wetlands, marshes and ponds) and man-made breeding sites (rice-fields, irrigation and drainage canals) that provide favorable breeding sites for reproduction of this species.

Entomological data were collected by longitudinal and sporadic surveys carried out in selected sites during 2005-2009. Mosquitoes were collected in indoor resting sites and human-bait night collections were also performed. Environmental parameters that could influence mosquito dynamics were analysed. For each site a representative number of specimens was identified in laboratory by egg-exochorion morphology and by Multiplex-PCR.

Historical data on the distribution and bionomics of anopheline species in Maremma, past data on malaria incidence and current data on imported cases (gametocyte carriers) were also acquired. The theoretical values of Vectorial Capacity of *An. labranchiae* were assessed (per site and per month) by the MacDonald formula.

The reproductive system of *Anopheles maculipennis s.s.*, *An. labranchiae* and *Anopheles stephensi* was compared and analyzed by using LM, SEM and TEM.

In order to identify the potential breeding sites and to assess the abundance of adults mosquitoes, geostatistical analysis through the use of GIS software and its module of Spatial Analyst were carried out on shape and raster data of land use, hydrography, occurrence of livestock and *An. labranchiae* collection data. Maps with spatial distribution of larvae and adult presence were produced according to Tran *et al.* [4]. Furthermore, a multi-category statistical model based on logistic regression and driven by climatic predictors was computed to describe the yearly absence/presence of *An. labranchiae* in the main collecting sites.

Results

A total of 9629 mosquitoes, belonging to 17 species, were collected. Out of total sample, 9364 (97.2%) were anophelines belonging to the *An. maculipennis* complex. A sample of 2230 (23.8%) was identified by morphological and molecular analysis.

The results highlighted that *An. labranchiae* is the most abundant species in coastal plain of Maremma Plain and its seasonal trends are different in each site. However, this species was also detected in the internal areas of Tuscany, Umbria and Lazio Regions. During 2005-2006, the species was found in province of Siena (in Val di Merse) and in province of Grosseto (in Cinigiano and in Casenovole villages); in 2007, adults of the species were collected in three sites of Viterbo province and, in 2008, in another site in Umbria Region, near the town of Narni (TR), confirming the first *An. labranchiae* detection occurred in 2003 in province of Terni (Alviano and Fabro villages) [5].

The results of the surveys and the development of a map of *An. labranchiae* distribution show a high **Receptivity** that takes into account presence, density, and biologic characteristics of the vector in the study area. These high densities of the species are strongly related to the presence of the most relevant breeding sites (rice-fields and marshes) and livestock density. The multi-category statistical model produced good performances describing the seasonal fluctuations of *An. labranchiae* in the main collecting sites.

In order to estimate the risk of transmission, a further entomological factor was taken into account, the **Vectorial Capacity** (VC). It is expressed as the number of potentially infective bites that originate daily from a carrier of gametocytes capable of infecting all the receptive mosquitoes that feed on the carrier, in a given area. VC is influenced by three factors: the anthropophily, longevity, and density of the vector. In a large area of rice cultivation (site 9), VC values were very low in June, constituting no real risk for malaria transmission (<0.01 for both *Plasmodium falciparum* and *P. vivax*). In July, VCs were high (5 to 10 for both *plasmodia*), and in August VCs were from 2 to 4 for *P. falciparum* and from 3 to 5 for *P. vivax*. In the same province, but in an area where only natural anopheline breeding sites are reported (site 10), the VCs in August ranged from 0.8 to 2 for *P. falciparum* and from 0.9 to 3 for *P. vivax*.

The other two epidemiological indexes forming the **Malariologenic Potential** are: **Infectivity** that represents the degree of susceptibility of mosquitoes to different *Plasmodium* species, and **Vulnerability** of a given area, that is determined by the number of gametocyte carriers during the period in which malaria transmission is possible. In Maremma a known infectability of the species with *P. vivax* [1], opposite to an apparent poor competence to transmit afro-tropical *P. falciparum* strains (NF54 lab-strain) was already demonstrated [6]. The study area also confirms a very low

vulnerability due to the scarce presence of gametocyte carriers potentially circulating during the favourable transmission season.

In this study the host sources of blood meals of mosquitoes were previously identified by ELISA technique (enzyme-linked immunosorbent assay). Subsequently for this purpose a novel Multiplex-PCR was developed and set up. It permits to identify a wider range of Vertebrate hosts (13 different species) of engorged mosquitoes caught during field collections. This analysis revealed that *An. labranchiae* feed on a wide range of hosts, mainly large mammals (bovine, sheep, pigs, horses), but also hen. Only a small number (4/282) of mosquitoes, identified as *An. labranchiae*, fed on humans. Much of what we know about the ultrastructure of mosquito female genitalia is based on an *Aedes* model, while anophelines appear to deviate from that model in several ways. In order to characterize the anopheline female reproductive system and to correlate morphological data with physiological events, spermatheca and accessory gland ultrastructures of *An. maculipennis s.s.*, *An. labranchiae* and *An. stephensi*, were studied for the first time. Besides, the effect of blood meal on the size of accessory gland during the gonotrophic cycle of *An. labranchiae* was also investigated.

Discussion

As expected, along the coastal plain of Maremma region *An. labranchiae* species results predominant, while *An. maculipennis s.s.* is the most abundant species in the internal areas (about 300 m a.s.l.). However, *An. labranchiae* is probably extending its range northward and eastward, across to the internal hills of Central Italy, where in the past, low levels of malaria transmission were supposed to be maintained by *Anopheles atroparvus* and/or *Anopheles messeae*, only. At present it is very difficult to establish if these findings could be the result of a new, slow but real expansion of *An. labranchiae* in these internal areas (after the malaria control campaign), or if, more simply, its presence was not detected in the past because of the ambiguous characters of the egg morphology that did not permit to distinguish this powerful vector from the other two species, when in sympatry [7].

An. labranchiae distribution and abundance show a high receptivity of the study area, in fact this species occurs at different densities related to climatic parameters, but also according to anthropic activities that may allow the colonization and the massive reproduction of the species, by modifying the natural environment (i.e. rice-fields). These findings aim to demonstrate that the development of statistical models and spatial distribution maps of malaria vectors are essential prerequisites to assess the risk of malaria re-emergence in Italy and to plan suitable control strategies. The VC of *An. labranchiae* results very high, especially in those areas where the high density of vector

depends on rice-field occurrence. However CV remains a purely theoretical value, because obtained by collecting mosquitoes on persons exposed to mosquito bites without any protection.

While the competence of *An. labbranchiae* from Maremma for exotic *P. vivax* strains has already been shown [1], attempts of artificial infections show a very low susceptibility of this mosquito vector to afro-tropical strain of *P. falciparum*, at least at the laboratory conditions [6].

In Italy, since 2000, a constant decrease of the imported malaria cases has been confirmed. In the study area, imported cases in Grosseto and Siena Provinces represented 10% of the all Tuscany cases (6% of the national cases). Immigration workers are mainly from East Europe and North-Africa.

Trophic activity of *An. labbranchiae* lasts from dusk to the beginning of the night, being mainly concentrated in the first hours after sunset. *An. labbranchiae*, as expected, results very aggressive during human bait catches, confirming the high anthropophilic degree of this species, among the *An. maculipennis* complex. The observations on feeding behaviour of *An. labbranchiae* suggest that the host choice is more related to the availability rather than to the specific attractiveness of the hosts and it is also confirmed by the low number of human blood meals, depending on difficult accessibility to human dwellings.

In order to clarify the morphology of the glandular epithelium and to elucidate the functional significance of the secretory process in the reproductive biology of Anophelines, the present study has also provided the first detailed descriptions of spermatheca and accessory gland ultrastructures in three species, *An. labbranchiae*, *An. maculipennis* s.s. and *An. stephensi*.

Conclusion

In the study area, the overall Malariogenic Potential appears to be low, as in other areas of the country where *An. labbranchiae* still persist in relevant densities; so a return to a situation of endemic malaria should be considered not possible (also due to the improved cultural and socio-economic conditions). Nevertheless the occurrence of isolated cases appears improbable but not impossible as already occurred in this area in 1997. In fact it is possible that illegal immigrants, coming from endemic malaria countries as seasonal workers, and afraid to attend public health facilities, may introduce gametocytes in rural “at risk” areas. It should be also considered that in the summer, tourists largely occurring in the area could be exposed to mosquito bites more than resident people.

However Maremma Plain represents a suitable study-model for epidemiological and entomological analysis on the risk assessment of malaria reintroduction. Indeed due to genetic, historical, social and epidemiological reasons, *An. labbranchiae* is the only species that may really represent a

potential risk of malaria re-emergence in those countries facing the Western side of the Mediterranean Basin. For this reason epidemiological and entomological surveillance has to go on, especially along the coastal Maremma Plain, where the relevant abundance of *An. labranchiae* still represents a concern about the possible reappearance of malaria in Italy.

Keywords: Maremma area, malaria, *Anopheles labranchiae*, vector, distribution map, spermatheca, female accessory gland, Malariogenic Potential, Vectorial Capacity

- 1) Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna P, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M. Introduced malaria in Maremma, Italy, decades after eradication. *The Lancet*, 1998; 351:1246-1248.
- 2) Romi, R, Pierdominici, G, Severini, C, Tamburro, A, Cocchi, M, Menichetti, D, Pili, E, Marchi, A. Status of malaria vectors in Italy. *J Med Entomol* 1997, 34(3):263-271.
- 3) Romi, R, Sabatinelli, G, Majori, G. Could Malaria Reappear in Italy? *Emerg Infect Dis* 2001, 7(6):915-919.
- 4) Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, De La Rocque S, Fontenille D, Baldet T. (2008). Using remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) a potential malaria vector in Southern France. *International Journal Of Health Geographics* 7:9.
- 5) Boccolini D, Di Luca M, Romi R. (2004). Preliminary findings on the distribution of the malaria vector *Anopheles labranchiae* in central Italy inferred by ITS2 analysis. XXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Vietri sul Mare (SA), 9-12 giugno. *Parassitologia*, 46 (Suppl. 1): 206.
- 6) Boccolini D, Di Luca M, Toma L, Severini F, VanGemert G, Mancini Barbieri F, Massa A, Luty A, Romi R. Feeding preferences and vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Tuscany), a former hyperendemic area in Central Italy. *Parassitologia*, 2008; 50 (1-2): 137.
- 7) Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Mancini Barbieri F, Massa A, Romi R. A 2-year entomological study of potential malaria vectors in Central Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2009, 9(6): 703-711.

PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni le malattie trasmesse da artropodi sono in sensibile aumento e le cause risiedono in quei fattori, sia antropici che naturali, che favoriscono lo sviluppo dei vettori e/o dei patogeni. Tra i fattori responsabili di tale aumento sono da annoverare eventi demografici (migrazioni, guerre), sociali (globalizzazione dei traffici commerciali, aumento dei viaggi intercontinentali), ambientali (urbanizzazione, erranea gestione del territorio e di determinate pratiche agricole) e cambiamenti climatici.

L'importanza delle zanzare come vettori di patogeni è legata soprattutto alla trasmissione della malaria, una malattia ampiamente diffusa in aree tropicali e subtropicali, dove causa ancora oggi milioni di morti l'anno. In Italia la malaria non è più endemica dai primi anni '50, tuttavia alcune specie anofeliche, potenziali vettori della malattia, sono tuttora presenti nel nostro territorio. Numerose sono inoltre le specie in grado di trasmettere arbovirus (dall'inglese *arthropode-borne virus*, ovvero virus trasmessi da artropodi vettori). Questi patogeni sono responsabili di infezioni che possono interessare o unicamente gli animali, o trasmettersi tra serbatoi animali e l'uomo (zoonosi), o talvolta, come nel caso della dengue, coinvolgere esclusivamente l'uomo. Queste malattie rappresentano alcuni dei più importanti esempi di malattie emergenti, oltre che di diffusione di infezioni in nuove aree geografiche. L'Italia, per la sua posizione geografica, risulta particolarmente interessata da tale fenomeno e l'allarme creato dai recenti episodi epidemici dovuti ai virus Chikungunya (nel 2007) e West Nile (nel 2008-2009), trasmessi da alcune specie zanzare, ha concretizzato il pericolo, paventato ormai da tempo dagli esperti. Le zanzare possono svolgere un ruolo epidemiologicamente rilevante anche nella trasmissione accidentale di filarie dagli animali all'uomo, ma non sono da sottovalutare anche come fonte di fastidio e di disturbo per molte attività umane, come quelle agricole e turistiche, alle quali spesso possono arrecare grave danno economico.

Nell'Italia centrale, la Maremma, è una delle principali aree a rischio di introduzione o reintroduzione di organismi patogeni, sia per la posizione geografica e gli aspetti climatici peculiari, sia per la presenza di insetti potenziali vettori in densità epidemiologicamente rilevanti. In Maremma alcune zoonosi sono radicate o emergenti, ma iniziative di prevenzione mirate alla sorveglianza, al controllo, all'informazione e all'educazione della popolazione, sono spesso sporadiche, circoscritte o comunque limitate nel tempo.

Il presente studio ha inteso analizzare, attraverso un approccio multidisciplinare, aspetti della biologia ed ecologia delle zanzare, in particolare delle specie anofeliche, approfondendo alcuni argomenti legati alla dinamica di popolazione, all'attività trofica e alla riproduzione. Inoltre in

questo studio si è voluto valutare il possibile rischio di reintroduzione in Maremma di malattie trasmesse da zanzare, come la malaria, attraverso la stima di indici epidemiologici, quali il potenziale malariogenico dell'area di studio e la capacità vettrice dell'antico vettore di malaria, *Anopheles labranchiae*. Il passo successivo è stata l'elaborazione di mappe di rischio e di modelli statistici che hanno permesso di valutare in che misura i fattori climatici ed ambientali possono influenzare la presenza, la densità e le fluttuazioni stagionali del potenziale vettore. La metodologia seguita, i risultati e le conclusioni raggiunte rappresentano uno strumento essenziale per la pianificazione di strategie di prevenzione e di intervento a difesa del territorio, della sanità pubblica e delle attività umane.

INTRODUZIONE

Le malattie trasmesse da vettori

Alcune delle parassitosi umane più gravi e diffuse nel mondo (malaria, leishmaniosi, tripanosomiasi africana e americana, filariasi linfatiche) sono veicolate da un artropode vettore, cioè un organismo che arreca all'uomo un danno indiretto attraverso la trasmissione di un agente patogeno. Essi si dividono in vettori meccanici, o attori, e vettori biologici. I primi, generalmente non ematofagi, quali blatte e mosche, trasportano meccanicamente il patogeno, infettandosi su feci, liquami o altri fluidi biologici e contaminando l'ambiente ed il cibo per contatto. I vettori biologici, come zanzare, flebotomi e zecche, sono sempre ematofagi e attraverso il pasto di sangue su un ospite infetto acquisiscono il patogeno che in essi si moltiplica e/o compie una fase del suo ciclo di sviluppo; la successiva puntura su un altro individuo determina la trasmissione dell'agente patogeno per via linfatica o ematica. L'efficienza con cui il vettore trasmette il patogeno è definita capacità vettrice. Risulta quindi di estrema importanza la comprensione della biologia e dell'ecologia dei vettori per sviluppare strategie efficaci che permettano di intervenire nel processo di trasmissione delle malattie.

I cambiamenti climatici e le malattie trasmesse da vettori

Numerose evidenze indicano che i cambiamenti climatici possono influire sulla comparsa e diffusione di malattie a trasmissione vettoriale (Vector-Borne Diseases o VBD), incidendo sulla riproduzione, sullo sviluppo, sulla dinamica di popolazione dell'artropode vettore e sulla sua capacità di ricerca dell'ospite e di trasmissione del patogeno. Questo dipende dal fatto che gli artropodi sono eterotermi e quindi direttamente dipendenti dalle fluttuazioni della temperatura (Rogers e Randolph, 2006, Pherez, 2007). La temperatura influenza anche lo sviluppo del patogeno all'interno del vettore ed essa, insieme all'umidità, può agire sulla sopravvivenza del vettore stesso e quindi sulla sua capacità vettoriale. Nelle zoonosi, le variabili climatiche determinano variazioni della distribuzione e dell'abbondanza anche degli ospiti vertebrati che fungono da serbatoi dell'infezione.

Il modo e gli effetti in cui il clima possa incidere sulle VBD sono comunque difficili da definire e soprattutto prevedere: in alcune aree il cambiamento climatico potrebbe determinare un aumento delle epidemie e della diffusione di alcune VBD, mentre potrebbero verificarsi effetti opposti in altre aree o per altre VBD. La difficoltà di prevedere tali scenari consiste nel fatto che molti fattori, quali l'ecologia del vettore e dell'ospite, le abitudini e il comportamento dell'uomo, l'uso del suolo e altre condizioni localmente variabili, unitamente ai cambiamenti climatici, sono direttamente

implicati nel determinare l'incidenza delle VBD. La previsione che l'innalzamento della temperatura del globo e l'aumento delle precipitazioni espanderà l'areale di certi vettori a latitudini ed altitudini maggiori può essere verosimile solo in alcuni casi, e comunque l'insediamento di un vettore recettivo per un certo patogeno non necessariamente condurrà all'introduzione e alla diffusione dell'infezione (Shope, 1991). Rappresentano casi esemplificativi alcune aree del sud degli Stati Uniti, in cui pur essendo presenti i vettori di dengue e di malaria (*Aedes aegypti* e *Anopheles quadrimaculatus*) e dove occasionalmente si rinvenivano sia zanzare che persone infette, la trasmissione rimane localizzata e limitata (Reiter *et al.*, 2003, Levine *et al.*, 2004). Inoltre in caso di zoonosi la situazione diventa ancora più complessa perché oltre al vettore, al patogeno e all'uomo, deve essere contemporaneamente presente anche un ospite vertebrato competente che funga da *reservoir*.

Quindi per determinare le variazioni nell'incidenza, nella diffusione e nella distribuzione geografica delle VBD è necessario disporre di dati, non solo presenti, ma soprattutto storici, che permettano di valutare la tendenza nel lungo termine dei parametri legati ai cambiamenti climatici e delle più importanti variabili che agiscono sia globalmente che localmente (trend di fattori economici; stima dei viaggi internazionali e del trasporto commerciale; valutazione della popolazione; presenza e diffusione di urbanizzazione, guerre e conflitti civili, immigrazione, profughi; disponibilità e gestione di risorse idriche; interventi di deforestazione e altri cambiamenti dell'uso del territorio; conoscenza dell'incidenza nel passato delle VBD e dell'ecologia e della biologia dei loro vettori) (Gage *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda le zanzare, gli effetti del clima sull'epidemiologia delle malattie da esse trasmesse, e in particolare delle arbovirosi, non sono facilmente prevedibili. L'incremento di temperature e precipitazioni, e la conseguente crescita del numero delle piccole raccolte d'acqua peridomestiche durante la stagione calda, potrebbero far aumentare l'incidenza di alcune arbovirosi quali dengue, febbre gialla e Chikungunya trasmesse da *Aedes aegypti* (Pontes *et al.*, 2000, Montath 2004, Chretien *et al.*, 2007). Alte temperature possono però aumentare la mortalità delle zanzare (Reeves *et al.*, 1994), così come forti precipitazioni possono distruggere i focolai larvali (Reiter, 2001); inoltre l'uomo può sempre evitare il contatto con le zanzare (Sutherst, 2004). E' necessario sottolineare, infatti, che cambiamenti delle abitudini umane (miglioramenti delle condizioni socio-economiche, nella gestione delle fonti idriche e del territorio, nella tipologia abitativa, uso dell'aria condizionata e idonei metodi di controllo delle zanzare) possono alterare l'incidenza dei casi umani di qualunque VBD (Gage *et al.*, 2008).

Alcuni Autori reputano che l'ampliamento di molte arbovirosi verso nord (dengue, febbre gialla, West Nile e Chikungunya) non sia attribuibile al cambiamento globale del clima, ma piuttosto

all'importazione dei virus eziologici in ecosistemi già recettivi, in periodi durante i quali il clima locale è favorevole alla loro trasmissione (Reiter, 2001, Reisen *et al.*, 2006). Ovviamente il clima influenza le dinamiche della trasmissione delle infezioni, ma lo fa attraverso complesse interazioni, molto spesso difficili da prevedere (Gatton *et al.*, 2005, Sutherst, 2004).

Nel caso della malaria, ad esempio, le temperature più alte possono aumentare la trasmissione, diminuendo il periodo di sviluppo del vettore e diminuendo il periodo di incubazione estrinseco e aumentando il titolo virale nelle zanzare (Reisen *et al.*, 2006, Sutherst, 2004). Alcune stime prevedono decine, o forse anche centinaia, di milioni di nuovi casi nelle regioni ad endemia malarica ed è ipotizzabile che vettori e patogeni possano spostarsi verso latitudini e altitudini maggiori. Presumibilmente i cambiamenti climatici dovrebbero avere un effetto sulla malaria determinando uno slittamento dell'areale geografico e quindi determinando epidemie lungo il margine dell'attuale areale di endemia a carico delle popolazioni non immuni (Gage *et al.*, 2008). Sebbene la relazione tra i cambiamenti climatici e trasmissione della malaria per il breve periodo sia indiscutibile, l'effettivo impatto del clima su questa infezione nel lungo termine rimane ancora oggetto di dibattito. La temperatura influenza sia la velocità di sviluppo del parassita nel vettore (per *Plasmodium falciparum* tra 16°-19°C, mentre per *Plasmodium vivax*, tra 14.5°-15°C) che la sopravvivenza del vettore stesso, e quindi la sua abbondanza. Reiter (2008) individua cinque fattori che possono incidere sull'epidemiologia della malaria: l'ecologia e il comportamento dell'uomo, l'ecologia e il comportamento del vettore e l'immunità dell'ospite. Questi parametri interagiscono tra loro e sono inoltre influenzati dalle variabili climatiche (temperatura, precipitazioni, umidità). Quindi, come per tutte le VBD, anche in questo caso è necessaria una visione olistica dell'epidemiologia, dell'ambiente in cui l'infezione viene trasmessa e dei potenziali fattori climatici implicati (Reiter, 2008). Sicuramente fattori antropici quali il cambiamento nell'uso del suolo, la resistenza ai farmaci e agli insetticidi e lo spostamento di popolazioni umane verso le città potrebbero avere un profondo impatto sulla distribuzione e l'incidenza della malaria (Jetten *et al.*, 1996; Rogers e Randolph, 2000; Kuhn *et al.*, 2002).

Sorveglianza delle malattie trasmesse da vettori

In un'era in cui i cambiamenti sono rapidi e globali, un'efficace prevenzione delle VBD richiede avanzati programmi di salute pubblica che contemplino e/o implementino sistemi di monitoraggio dei vettori e di controllo delle infezioni, mediante l'impiego di repellenti e vaccini efficaci, parallelamente al miglioramento delle condizioni socioeconomiche (Gage *et al.*, 2008). Inoltre risulta necessario sviluppare efficaci e sostenibili misure di controllo dei vettori di malattie per adeguare piani di intervento che si basano spesso sull'uso esclusivo ed indiscriminato degli insetticidi.

L'introduzione della febbre West Nile nel Nord America e la sua rapida ed inarrestabile diffusione lungo il continente esemplifica l'importanza di un efficace sistema di sorveglianza e di controllo per la salute pubblica. Naturalmente gli sforzi per migliorare la nostra conoscenza delle VBD, per sviluppare sistemi di sorveglianza e potenziare la nostra capacità di risposta richiedono ingenti risorse economiche. E' necessario prevedere un sistema di sorveglianza e di allerta precoce che si attivi in caso di epidemia da VBD e che permetta di seguire tutte le alterazioni nella trasmissione e nell'incidenza delle malattie (fattori climatici e ambientali; dati ecologici e comportamentali dei potenziali vettori) per mettere in campo efficaci strategie preventive e di controllo (Hayes *et al.*, 2005, O'Leary *et al.*, 2004, Gage *et al.*, 2008). Inoltre alcune zone strategiche, quali aree aeroportuali e portuali, dalle quali eventuali vettori, patogeni e ospiti potrebbero arrivare e diffondere, richiedono una sorveglianza specifica e costante. Qualora un vettore o se invece un patogeno dovesse comparire in un'area dove non era mai stato presente, dovrebbero essere intrapresi sforzi per determinare se si tratta di un evento isolato e temporaneo o possa rappresentare un reale insediamento del vettore o del focolaio di infezione. In questo caso, se l'infezione fosse di tipo zoonotico, dovrebbe immediatamente iniziare anche la ricerca del potenziale vertebrato ospite.

I dati che regolarmente provengono da un sistema di sorveglianza e di monitoraggio possono essere usati anche per esplorare l'impatto dei fattori climatici sulla trasmissione e l'incidenza della malattia (Reisen *et al.*, 2006), sviluppando e valutando appropriati modelli matematici. Tali modelli possono risultare utili per scopi di pianificazione e per aiutare le autorità sanitarie a prevenire rischi per la salute umana derivanti dalle VBD. Oggi è possibile utilizzare modelli matematici che permettono di descrivere sistemi complessi (Murray, 2002): vengono elaborati modelli stocastici, realizzati con set di variabili selezionate, che si basano su una serie di equazioni differenziali. Spesso questi modelli, supportati dai dati di campo, vengono ampiamente utilizzati nell'epidemiologia delle malattie infettive per esplorare le dinamiche della trasmissione e capire come i fattori climatici possano interferire nella loro trasmissione (Confalonieri *et al.*, 2007). L'applicazione efficace di modelli che predicano gli effetti del cambiamento del clima su queste

malattie richiederà probabilmente un'attenta considerazione delle condizioni ecologiche e microclimatiche locali.

Un'altra via nella ricerca di nuove strategie di controllo degli insetti di importanza sanitaria consiste nell'influenzare, destabilizzandoli, alcuni importanti processi vitali quali quelli legati alla riproduzione o alla capacità di trasmettere il patogeno. La conoscenza dell'apparato riproduttore femminile delle zanzare, ad esempio, si basa soprattutto su studi morfologici e fisiologici condotti sulle specie del genere *Aedes*, mentre dai rari studi condotti sui vettori di malaria, le specie anofeliche sembrerebbero avere caratteristiche differenti. Ad esempio in *Anopheles* non esiste la borsa copulatrice come in *Aedes*, mentre è presente una singola spermateca (rispetto alle tre in *Aedes*) e una ghiandola accessoria femminile, piccola e globulare. La ghiandola accessoria femminile è un organo annesso all'apparato riproduttore, posto dorsolateralmente al retto e posteriormente alla spermateca, che si apre nella porzione apicale della vagina con un dotto impari. Negli insetti è un organo altamente specializzato e presenta una notevole variabilità a livello di struttura, di tipologia di cellule, di modalità di secrezione e di composizione del secreto. Questa ghiandola svolge un ruolo fondamentale legato alla riproduzione: in alcune specie essa produce sostanze che ricoprono e fissano le uova al substrato, forniscono protezione e/o lubrificazione alle uova o possono direttamente partecipare alla fecondazione, attivando gli spermatozoi o aprendo il micropilo dell'uovo (Adiyodi e Adiyodi, 1975 e 1983; Davey, 1985; Happ, 1992; Gillott, 2003; Kaulenas, 1991; Degrugillier e Leopold, 1976). Nei flebotomi, piccoli ditteri vettori di leishmania e di altri importanti patogeni, la ghiandola accessoria femminile è stata descritta sia a livello ultrastrutturale (Fausto *et al.*, 1997) che funzionale (Rosetto *et al.*, 2003). Sono stati, infatti, identificati e caratterizzati alcuni componenti del secreto che presentano un'attività lisozima-simile, confermando un possibile ruolo antibatterico della secrezione ghiandolare.

La funzione della ghiandola accessoria femminile risulta ancora sconosciuta in *Anopheles*, mentre risulta avere un ruolo connesso al ciclo ovarico in *Aedes* (Jones e Wheeler 1965, Rossignol *et al.* 1977) and *Culex* (Rosay, 1968).

Le zanzare e la loro importanza sanitaria

I Culicidi o zanzare sono ditteri ematofagi, cosmopoliti, dotati di una grande capacità di adattamento, e comprendono più di 3.000 specie. Il loro ciclo biologico è strettamente legato all'acqua e qualunque raccolta d'acqua può rappresentare un potenziale focolaio di sviluppo per una o più specie. In Italia fanno parte della fauna culicidica 64 specie, suddivise in due sottofamiglie, Anofelinae, con il solo genere *Anopheles*, e Culicinae con i generi *Culex*, *Culiseta*, *Aedes*, *Ochlerotatus*, *Orthopodomyia*, *Coquillettidia* ed *Uranotaenia* (Romi *et al.*, 1997a) e tra queste solo alcune specie rivestono una reale importanza sanitaria.

L'importanza delle zanzare come vettori di agenti patogeni è legata soprattutto alla trasmissione della malaria, un'infezione ampiamente diffusa nelle regioni tropicali e subtropicali, responsabile ancora oggi di milioni di morti l'anno. Questa infezione è trasmessa da circa 60 specie tra le 450 appartenenti al genere *Anopheles*, ma di esse meno di una trentina ha il ruolo di importante vettore e molte di esse appartengono a complessi di specie. Ad esempio con il termine di complesso *Anopheles maculipennis* si indica un insieme oloartico di specie gemelle, cioè morfologicamente indistinguibili, ma che mostrano però differenze notevoli dal punto di vista ecologico e comportamentale. In Europa questo complesso comprende 7 taxa: *Anopheles maculipennis s.s.*, *Anopheles labranchiae*, *Anopheles atroparvus*, *Anopheles melanoon*, *Anopheles messeae*, *An. sacharovi*, e *Anopheles beklemishevi*. Queste specie possono essere parzialmente identificate in base alla morfologia delle uova e in misura ancora più limitata allo stadio larvale, con l'analisi biometrica della somma del numero di rami del paio di setole antepalmate del IV e V segmento addominale. Oggi, grazie ad approcci biochimici (Bullini e Coluzzi, 1973) e molecolari (Marinucci *et al.*, 1999, Proft *et al.*, 1999; Romi *et al.*, 2000, Kampen, 2005) è possibile una completa discriminazione tra le specie.

Molte specie di zanzare sono in grado di trasmettere arbovirus, appartenenti alle famiglie Bunyaviridae, Togaviridae e Flaviviridae. La gran parte delle arbovirosi sono infezioni che interessano unicamente gli animali, alcune si trasmettono tra serbatoi animali e l'uomo (zoonosi), poche sono le malattie trasmesse esclusivamente da uomo a uomo (antroponosi), come la dengue e la febbre da Chikungunya (CHIK). I culicidi sono anche in grado di trasmettere elminti appartenenti alla superfamiglia Filarioidea. In genere le zanzare, oltre alla potenziale capacità di veicolare patogeni, rappresentano una fonte di fastidio per le loro punture, ma in molti casi questo fastidio supera le soglie della sopportabilità e ostacola le attività all'aperto, in particolare quelle turistiche.

La malaria

La malaria è una delle più importanti malattie trasmesse da culicidi del genere *Anopheles*. Essa è diffusa soprattutto nelle zone tropicali in forma endemica o epidemica, ma è anche presente in alcune regioni temperate. Si stima che l'incidenza globale di questa malattia sia di 300-500 milioni di casi l'anno, con circa 1,5-3 milioni di decessi, soprattutto a carico dei bambini che vivono nelle aree tropicali (Greenwood *et al.*, 2005).

Gli agenti eziologici della malaria sono Protozoi appartenenti al Phylum Apicomplexa, Classe Coccidea (Sporozoasidea), Ordine Eucoccidiida, Famiglia Plasmodiidae, Genere *Plasmodium*.

Le specie plasmodiali che principalmente infettano l'uomo sono quattro: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* e *Plasmodium malariae* (Ayala *et al.*, 1999). Recentemente, visto il numero di infezioni umane causate da *Plasmodium knowlesi*, parassita dei primati e diffuso nella regione del Borneo, questa specie viene oramai considerata la quinta specie plasmodiale umana (White, 2008).

Questi parassiti hanno avuto origine in Africa e il loro adattamento all'uomo è avvenuto varie volte e indipendentemente. Quindi si sono distribuiti ad altre regioni calde, seguendo gli spostamenti dell'uomo verso l'area Mediterranea, la Mesopotamia, la Penisola Indiana e il Sud-Est Asiatico. Quando e come la malaria abbia raggiunto il nuovo mondo è oggetto di ipotesi in quanto non si hanno testimonianze storiche. E' probabile che *P. vivax* e *P. malariae* vi siano giunti nel primo millennio dal Sud-Est Asiatico con i primi viaggiatori, attraverso l'Oceano Pacifico, e che *P. falciparum* sia arrivato in epoca post-Colombiana con gli schiavi dell'Africa deportati intorno al 1500 (Conway *et al.*, 2000; Cox-Singh e Singh, 2008).

I plasmodi della malaria sono parassiti dixerici dotati di notevole specificità parassitaria, il cui ciclo vitale viene completato tra un ospite vertebrato e una delle circa 60 specie del genere *Anopheles*, presenti nel mondo. I parassiti si moltiplicano per schizogonia (divisione multipla per mitosi del nucleo seguita da divisione cellulare) nelle cellule del parenchima epatico (ciclo pre-eritrocitario) e poi nei globuli rossi (ciclo eritrocitario); qui si formano anche i gametociti che, ingeriti dall'insetto vettore, maturano a gameti nello stomaco di quest'ultimo dove si accoppiano originando uno zigote mobile (oocinete). Segue la formazione di un'oocisto contenente numerosi sporozoiti (ciclo sporogonico) che, raggiunte le ghiandole salivari, vengono iniettati con la saliva all'uomo (Fig. 1 e Fig. 2). Nella maggior parte del loro ciclo vitale questi protozoi sono aploidi in quanto la meiosi avviene subito dopo la fecondazione (Aikawa, 1988).

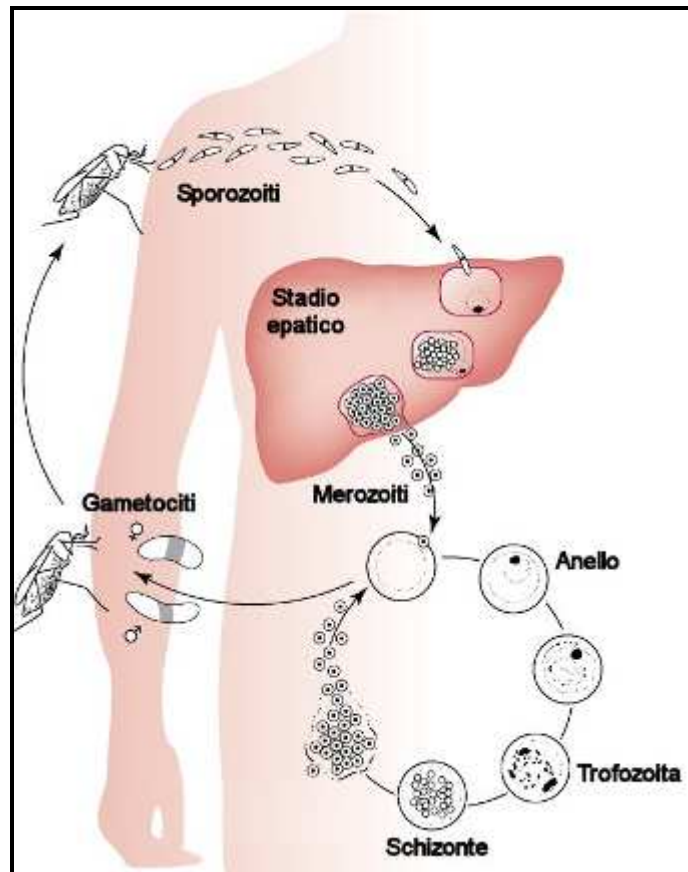


Figura 1. Ciclo biologico dei plasmodi della malaria (Craig *et al.*, 2003).

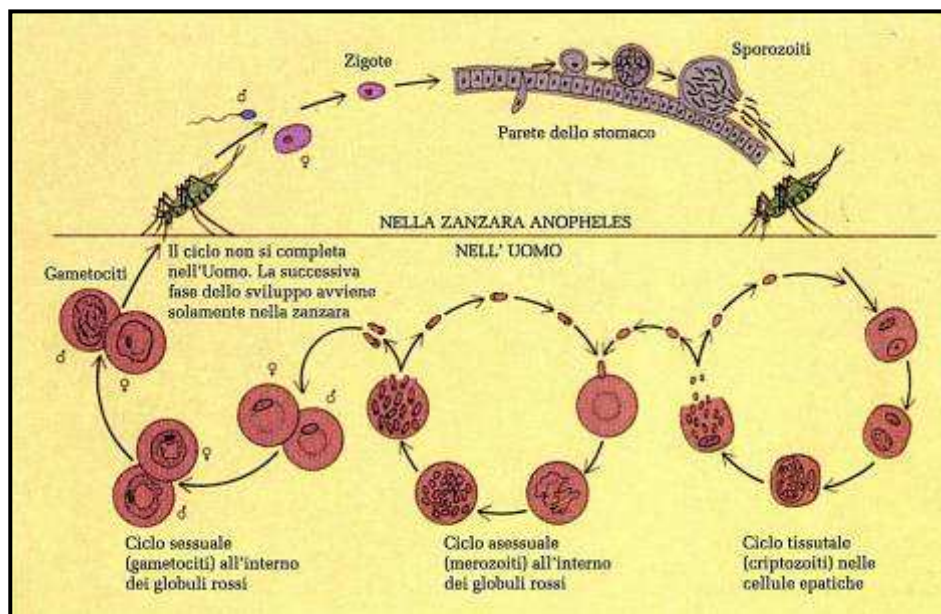


Figura 2. Particolare del ciclo biologico dei plasmodi nell'*Anopheles* e nell'uomo.

Rischio di emergenza e di riemergenza delle malattie trasmesse da zanzare in Italia

Le malattie trasmesse da vettori sono attualmente in continua crescita in Europa e soprattutto in l'Italia, dove la posizione geografica e i mutamenti climatici in corso, favoriscono tali eventi (WHO, 2007). L'insediamento e la diffusione di specie di zanzare, quali *Aedes albopictus* (la zanzara tigre), e l'aumento dei casi importati di arbovirosi, aumentano il rischio che queste malattie di origine tropicale possano diffondersi e diventare stabili anche in Europa. A tale proposito si consideri l'evento epidemico di Chikungunya (CHIK) avvenuto in provincia di Ravenna tra luglio ed ottobre 2007. In Italia quindi è avvenuta la prima epidemia di un'arbovirosi tropicale in Europa che ha contato circa 250 casi umani ed il CHIK virus è stato trasmesso dalla zanzara tigre, come è stato dimostrato sperimentalmente (Rezza *et al.*, 2007).

Anche *Culex pipiens*, la zanzara comune con cui si convive da sempre, è stata più volte implicata nella trasmissione del virus della West Nile (WN) in Nord America, nell'Europa continentale e recentemente anche in Italia. Un'epidemia di WN si è già verificata in Toscana nel 1998 a carico di soli cavalli (Autorino *et al.*, 2002; Romi *et al.*, 2004), ma nel 2008 e 2009 focolai epidemici della stessa malattia si sono verificati in Emilia Romagna, Lombardia e Veneto, coinvolgendo anche uomini (Rossini *et al.*, 2008, Rizzo *et al.*, 2009).

Recentemente in Piemonte e nel Lazio è stata dimostrata la capacità di *Ae. albopictus* di trasmettere filarie (*Dirofilaria immitis* e *Dirofilaria repens*), vermi parassiti dei cani e di carnivori selvatici, che possono essere accidentalmente trasmessi all'uomo, nel quale però non sono in grado di riprodursi (Cancrini *et al.*, 2003a,b; Cancrini *et al.*, 2007).

In Italia la malaria non è più endemica dai primi anni '50 (Fig. 3), tuttavia data la persistenza sul territorio di specie del genere *Anopheles*, potenziali vettori di malaria, va considerata la possibilità che si possano verificare casi autoctoni, come avvenuto in Toscana nel 1997 (Baldari *et al.* 1998).

Quadro storico della malaria in Italia e in Toscana



Figura 3. A sinistra, la mappa della diffusione della malaria in Italia realizzata dal senatore Luigi Torelli nel 1882 (in rosso le aree iperendemiche, in giallo quelle mesoendemiche; a destra la situazione malarica nella provincia di Grosseto nel 1832 (in giallo le aree iperendemiche).

All'inizio della seconda guerra mondiale la malaria era ancora diffusa in gran parte dell'Europa e in particolare in Italia era presente al centro-sud e nelle isole maggiori, lungo le fasce costiere delle regioni nord-orientali, con propaggini di ipoendemia nella Pianura Padana (Hackett, 1937). La malaria fu eliminata come conseguenza dei cambiamenti nello sfruttamento delle terre, nella pratica agricola, nella costruzione delle case ed in alcune strategie di controllo. Infatti, nell'immediato dopoguerra, per bloccare la recrudescenza della malaria, fu proposto un piano quinquennale che ne prevedeva l'eradicazione. Esso fu condotto attraverso il ripristino delle opere di bonifica che erano state parzialmente distrutte durante la guerra, ma soprattutto attraverso le campagne di lotta al vettore, basate sull'uso intradomiciliare di DDT. Benché agli inizi degli anni '50, la malaria fosse di fatto debellata (Soper *et al.* 1947, Canaperia e Patrissi 1948, Missiroli, 1948), persistettero isolati focolai di *P. vivax* in Sicilia fino alla prima metà degli anni '60 (Cefalù e Gullotta 1959, Lazzara *et al.* 1967), tanto che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) dichiarò ufficialmente l'Italia libera da malaria solo nel 1970. Ai tempi dell'endemia, i principali vettori di malaria erano tre: *Anopheles labranchiae*, *Anopheles sacharovi*, appartenenti al "complesso *maculipennis*" (Missiroli *et al.*, 1933; White, 1978), che raggruppava 7 specie morfologicamente indistinguibili, ma con competenze vettoriali diverse, e *Anopheles superpictus*.

An. labranchiae era il vettore principale lungo le pianure costiere di gran parte dell'Italia continentale, mentre in Sicilia e in Sardegna occupava anche aree più interne, fino ad altezze non superiori ai 1000 m s.l.m.; *An. sacharovi* si rinveniva principalmente nella parte settentrionale della Sardegna e lungo le pianure costiere adriatiche del nord-est, dove giocava il suo ruolo più importante come vettore per l'assenza di *An. labranchiae*. *An. superpictus* era considerato vettore secondario in Italia centromeridionale ed in Sicilia. Altre specie appartenenti al complesso *maculipennis* contribuivano al mantenimento di bassi livelli di endemia in alcune zone interne del paese, dove i due principali vettori erano assenti. Al termine della campagna quinquennale antimalarica, avviata nel 1947, le specie vettrici risultarono assenti o comunque drasticamente ridotte di densità (Raffaele, 1964).

In alcune aree storicamente iperendemiche della Toscana, come la Maremma, e della Sardegna dove il vettore *An. labranchiae* era molto abbondante, le operazioni di controllo della malaria continuarono per altri dieci anni (Aitken e Casini 1966, Majori *et al.* 1970). In particolare, durante periodiche indagini entomologiche condotte in Maremma, questa specie non fu più rinvenuta fino alla fine degli anni '60, mentre nei focolai larvali furono identificate altre specie anofeliche (Coluzzi e Finizio 1966, Majori *et al.* 1970).

Agli inizi degli anni '70, nonostante il parere sfavorevole delle autorità sanitarie locali, fu introdotta la coltivazione del riso nella provincia di Grosseto e vaste aree furono allagate, fornendo in determinati periodi dell'anno l'habitat ideale per la proliferazione delle zanzare. Negli anni successivi, la sorveglianza entomologica condotta nell'area ha mostrato una costante crescita nella densità di *An. labranchiae* che nel 1994 ha raggiunto il 100% del campione totale delle specie anofeliche raccolte (Bettini *et al.* 1978, Romi *et al.* 1992).

In seguito la sorveglianza e le misure di controllo furono consolidate per ridurre lo sviluppo larvale nelle risaie e periodiche indagini entomologiche furono estese anche alle zone risicole dell'interno, nella Val di Merse, in Provincia di Siena, dove erano riportate elevate densità di *Anopheles atroparvus* (80%) e *Anopheles maculipennis sensu stricto* (20%) (Romi *et al.* 1992), altre specie del complesso *maculipennis*.

Una vasta indagine sullo *status* dei vettori di malaria in Italia, condotta verso la metà degli anni '90, identificò la Maremma quale zona ad elevato rischio di reintroduzione della malattia nel paese (Romi *et al.* 1997b).

A conferma di questo, nel 1997 nella provincia di Grosseto si verificò un caso di malaria autoctona, (Baldari *et al.* 1998, Romi *et al.* 2001) e in conseguenza di questo evento, furono rafforzate le attività di sorveglianza e controllo dei focolai anofelici (Regione Toscana, 1998).

Rischio di reintroduzione della malaria in Italia

Il 17 novembre 1970 l'Italia è stata inclusa dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nella lista dei paesi indenni da malaria. Da allora, la quasi totalità dei casi registrati nel nostro Paese sono di importazione, cioè contratti all'estero in zone di endemia (Tab. 1).

IMPORTATA	Malaria acquisita in un paese endemico e manifestatasi in uno indenne;
AUTOCTONA	Malaria contratta localmente a) <i>indigena</i> : malaria trasmessa da vettori in un un'area in cui la parassitosi è endemica; b) <i>introdotta</i> : malaria trasmessa da zanzare locali infettatesi su un caso importato, in un'area dove la malaria non è normalmente presente;
INDOTTA	Malaria non trasmessa da vettore, ma risultante da un'infezione prodotta artificialmente, ad esempio per trasfusione di sangue (malaria trasfusionale) o per un'altra forma di inoculazione parenterale (scambi di siringa tra tossicodipendenti o eventi accidentali);
CRIPTICA	Caso isolato di malaria che non risulta classificabile in nessuna categoria sopra descritta. Rientrano in questa definizione i casi da “malaria da aeroporto”, “malaria da bagaglio”, ecc.

Tabella 1. Classificazione dei casi di malaria.

La gravità e la complessità del quadro malariologico attuale nelle zone tropicali del pianeta e la crescente mobilità di persone tra paesi tropicali e paesi a clima temperato alimentano la preoccupazione per il rischio di reintroduzione della malaria in Italia. Inoltre, a conferma di questi timori, nell'agosto del 1997 si è verificato, in provincia di Grosseto, il già citato caso di malaria da *P. vivax*, ragionevolmente trasmesso dal vettore locale, *An. labranchiae*, infettatosi su una bambina portatrice di gametociti appena giunta dall'India. Tale episodio ha rappresentato il primo caso documentato di trasmissione autoctona dopo l'eradicazione (Baldari *et al.* 1998).

Per verificare che possano sussistere gli elementi necessari per una ripresa locale di questa infezione (uomo, vettore e parassita) è necessario valutare il potenziale malariogenico di una determinata

area, indice che stima il rischio di reintroduzione della malaria in quell'area (Romi *et al.*, 2001). Questo parametro si determina considerando tre fattori: recettività, infettabilità e vulnerabilità.

La Recettività

La recettività valuta la presenza del vettore in un'area, la sua densità e le sue caratteristiche biologiche. Per stimare questo parametro vengono valutati i dati storici e i risultati delle inchieste entomologiche condotte in Italia nel quadro della sorveglianza epidemiologica. In Italia, durante il periodo di endemia malarica, la trasmissione era sostenuta da tre specie vettrici: *An. labranchiae*, *An. sacharovi* e *An. superpictus*. Sebbene la densità di queste specie sia stata fortemente ridotta grazie agli interventi antimalarici della campagna di eradicazione iniziata nel 1947, *An. labranchiae* e *An. superpictus* sono tuttora presenti in densità epidemiologicamente rilevanti in Toscana, limitatamente alla provincia di Grosseto, in Calabria, Puglia, Sicilia e Sardegna, dove permangono caratteristiche idrogeologiche o

ambientali idonee allo sviluppo di questi vettori (Romi, 1999; Bietolini *et al.*, 2006) (Fig. 4). Per quel che riguarda *An. sacharovi*, non ne è stata più segnalata la presenza da oltre 30 anni.

L'elevata densità di popolazioni anofeliche riportata in alcune zone del nostro Paese, tuttavia, non costituisce necessariamente condizione di grave pericolo per la ripresa della trasmissione, ma impone la valutazione di un altro fattore entomologico, la capacità vettrice o *basic reproduction rate*, importante per stimare tale rischio nelle diverse aree.

La capacità vettrice (CV) di una popolazione di zanzare esprime il numero di punture potenzialmente infettanti che possono originare in un giorno da un soggetto portatore di gametociti, capace di infettare tutte le zanzare sensibili che compiano su di esso un pasto di sangue. Questo indice rappresenta, quindi, l'efficienza con cui il vettore trasmette il patogeno e dipende da una serie di fattori che sono estrinseci alla specie (fattori ambientali, climatici, socio-economici ecc.) ed intrinseci (fattori biochimici, cellulari, etologici). Alcuni di questi fattori, quali la preferenza per l'ospite (endo/zoofilia) o la suscettibilità all'infezione, sono determinati geneticamente e

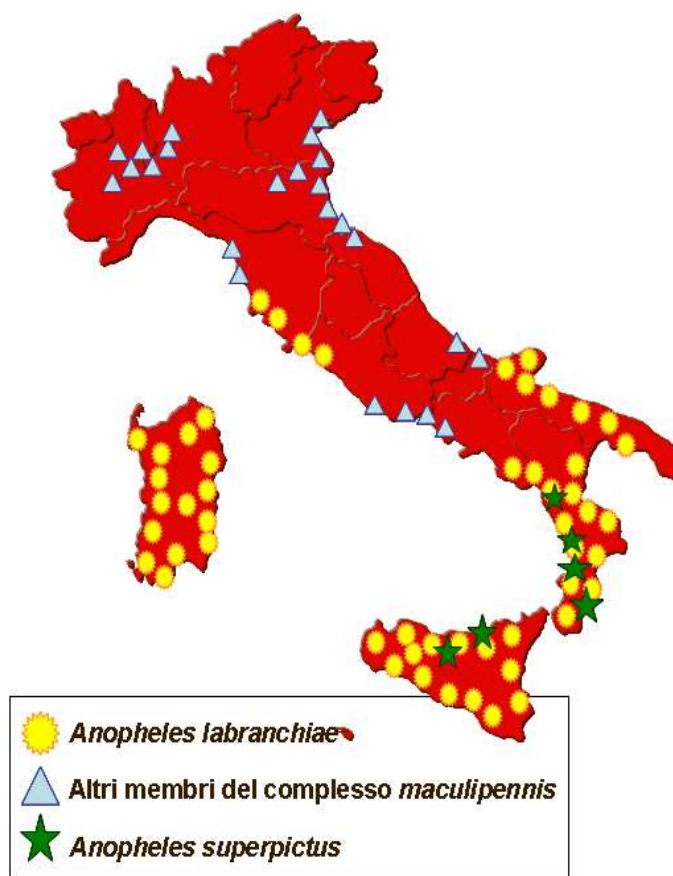


Figura 4. Distribuzione attuale dei vettori di malaria in Italia.

definiscono la competenza vettoriale (Bruce-Chwatt, 1985). Per esempio un vettore può essere geneticamente e biochimicamente compatibile allo sviluppo del parassita, ma può non coesistere spazialmente e temporalmente con la specie ospite del parassita o succhiare il sangue su un altro ospite (Cancrini, 1996). La capacità vettrice viene normalmente espressa dalla seguente formula, che prende in considerazione i principali fattori che la determinano (longevità, antropofilia e densità del vettore):

$$CV = \frac{ma^2 p^n}{- \log_e p}$$

m = numero medio di vettori/uomo

a = numero medio di punture su uomo/giorno/vettore (tiene in considerazione sia l'antropofilia (Human Bite Index, HBI) che la frequenza di puntura del vettore, in genere un pasto ogni 2-3 giorni)

ma = numero medio di punture/uomo/giorno (parametro valutabile mediante osservazioni dirette sul campo, esponendo alle punture un certo numero di persone in diverse condizioni ambientali e calcolando il numero di vettori da cui vengono punte); è definito anche Human Bite Rate (HBR o h)

p = probabilità di sopravvivenza del vettore in un giorno, derivabile dalla frequenza di femmine pare nella popolazione

n = durata in giorni del ciclo sporogonico nella zanzara (numero di giorni necessari perché l'insetto diventi infettante), diverso per ogni plasmodio e variabile in rapporto alla temperatura cui la zanzara è esposta

pⁿ = probabilità che il vettore infetto diventi infettante, ossia che sopravviva fino al termine del ciclo sporogonico

1/ - log_ep = attesa di vita, cioè longevità media del vettore (espressa in giorni)

pⁿ/ - log_ep = attesa di vita dei vettori infettanti

La Capacità Vettrice, stimando i livelli di rischio in un'area, ha un valore fondamentale nella pianificazione di programmi di controllo. In Africa, nella zona di Garki (Nigeria, Stato di Kano), area ad endemia malarica, è stato calcolato il valore critico della capacità vettrice, il valore cioè al di sotto del quale si destabilizza la trasmissione e corrisponde a 0.022; cioè alla produzione media di circa 1 puntura infettante ogni 50 giorni a partire da un singolo caso di malaria (Molineaux *et al.*, 1980).

Già nel 1978 fu fatto un primo tentativo per calcolare la capacità vettrice di popolazioni di *An. labranchiae* presenti in Calabria e i valori erano compresi tra 0.82 e 8.9, con una densità media di

punture per persona per notte di 16 (Coluzzi e Coluzzi, 1980). Nel 2001, Romi e collaboratori riportarono valutazioni della capacità di *An. labranchiae* calcolate in due diversi siti in provincia di Grosseto, sia per *P. falciparum* che per *P. vivax* (Tab. 2). Il primo studio riguardava catture effettuate nel 1994 in un sito risicolo del grossetano e gli alti valori di CV risultarono indubbiamente influenzati dall'alto numero di punture per uomo per notte (>200) (Romi *et al.*, 1997b); nel secondo caso lo studio fu condotto in un'area della stessa provincia, nel 1998, dove erano presenti focolai naturali della specie e qui i valori di CV risultarono molto più bassi, con un valore di punture per uomo per notte pari a <10 (Romi, 1999).

	Risaia, 1994		Focolai naturali, 1998	
	(S. Donato, Orbetello)		(Castiglione della Pescaia)	
	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>P. vivax</i>
Metà luglio	< 0,01	-	-	-
Inizio agosto	7	8	0.8	0.96
Fine agosto	26	32.5	2.9	3.3

Tabella 2. Capacità vettrice per *P. falciparum* e *P. vivax* in provincia di Grosseto

I valori di CV osservati in alcune zone dell'Italia risultano quindi epidemiologicamente rilevanti e pertanto tali zone risulterebbero recettive. Va comunque sottolineato che la CV è un indice puramente teorico: esso è ottenuto con catture di zanzare effettuate su volontari che si espongono alla puntura delle zanzare, mentre in condizioni normali, un soggetto non rimane esposto così a lungo e senza mettere in atto opportune misure protettive.

L'Infettabilità

L'infettabilità rappresenta il grado di suscettibilità del vettore locale alle diverse specie e ceppi di plasmodio. Una specie è altamente suscettibile quando il parassita può completare il ciclo sporogonico nella zanzara stessa. È noto che solo poche specie di zanzare del genere *Anopheles* sono in grado di infettarsi e di trasmettere la malaria; inoltre, è stato evidenziato come popolazioni di zanzare della stessa specie possano presentare, per ragioni genetiche, un diverso grado di sensibilità ai plasmodi (competenza vettoriale) o risultare completamente refrattarie all'infezione con ceppi di plasmodi appartenenti alla stessa specie plasmodiale, ma provenienti da zone geografiche diverse. Poiché in Italia i plasmodi malarici sono stati eradicati in Italia da tempo,

risulta importante determinare se le zanzare autoctone siano ancora sensibili all'infezione con plasmodi provenienti dalle zone ad endemia malarica.

Le poche evidenze scientifiche disponibili (de Zulueta *et al.*, 1975; Ramsdale e Coluzzi, 1975) e alcuni recenti esperimenti (Boccolini *et al.*, 2008) sembrano indicare la refrattarietà o almeno la bassa suscettibilità di *An. labranchiae* ad infettarsi con ceppi afro-tropicali di *P. falciparum*. È invece ormai certo che la specie possa trasmettere *P. vivax*, come dimostra l'epidemia avvenuta in Corsica nel 1971 (Sautet e Quilici, 1971), i 5 casi occorsi in Grecia nel 1975-76 (Zahar, 1990) e il caso sporadico di Grosseto (Baldari *et al.*, 1998).

La sensibilità di *An. superpictus* per *P. falciparum* di origine africana non è stata mai saggiata, ma è probabile che questa zanzara sia sensibile, poiché appartiene al sottogenere *Cellia*, come i principali vettori africani di malaria.

La Vulnerabilità

La vulnerabilità di un territorio dipende dal numero di portatori di gametociti circolanti in un'area, che potenzialmente possono infettare il vettore, durante la stagione favorevole alla trasmissione della malaria. Questo valore rappresenta, quindi, solo una parte dei casi importati nel Paese ed inoltre, poiché la distribuzione dei potenziali vettori è limitata ad alcune aree dell'Italia centromeridionale ed insulare, ai fini della sua valutazione vanno considerati solo i casi potenzialmente infettanti che occorrono annualmente tra giugno e ottobre nelle regioni considerate a rischio.

L'analisi dei casi di malaria importata, effettuata dall'Istituto Superiore di Sanità dal 1970 ad oggi, dimostra come questo parametro sia attualmente molto basso nel nostro paese (Romi *et al.*, 2002; Boccolini *et al.*, 2007). Ad esempio, degli 885 casi importati registrati nel 1997, solo 25 casi (2.8%) si sono verificati in persone che soggiornavano nelle aree rurali a rischio nella stagione favorevole alla trasmissione, e di questi 25 pazienti, solo 8 erano portatori di gametociti, e solo 6 di questi ospitavano gametociti di *P. vivax* (0.7% di tutti i casi di malaria registrati in Italia in quell'anno) (Romi *et al.*, 1997b).

MATERIALI E METODI

AREA DI STUDIO

L'area di studio è situata in una vasta zona dell'Italia Centrale, compresa tra le province di Grosseto, Siena e Viterbo (Fig. 5) e che comprende la Maremma, territorio in cui la malaria è stata endemica fino alla metà del secolo scorso.

La Maremma si estende lungo la fascia tirrenica e copre una superficie di oltre 5.500 Km², con una profondità dalla linea di costa

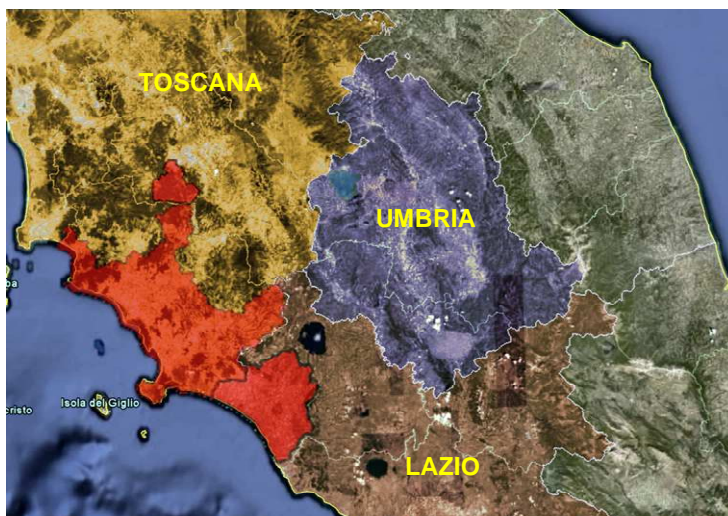


Figura 5. L'area di studio, la Maremma (in rosso), a cavallo tra Toscana e Lazio.

che varia tra 16 e 50 Km, abbracciando la parte più meridionale della Toscana e il nord

del Lazio, fino alle pendici degli Appennini. I confini geografici, e quindi l'estensione della Maremma, sono più volte mutati negli ultimi secoli in seguito ad eventi naturali ed antropici. Attualmente circa l'8,8% di questa regione è ricoperto da parchi naturali per circa 44.000 ettari, il 10% dei quali è rappresentato da zone umide, potenziali focolai larvali per molte specie di zanzare. L'area è caratterizzata da una grande varietà di biotopi (coste sabbiose, dune, macchia mediterranea, boschi, praterie, zone coltivate) e da numerosi corpi d'acqua naturali (paludi, lagune, stagni, laghi, fiumi e torrenti). In Figura 6 viene riportato il profilo schematico dei principali biotopi presenti in Maremma, che si succedono dalla linea di costa fino alle colline.



Figura 6. Successione di biotopi in Maremma.

Le principali attività umane sono l'agricoltura, l'allevamento zootecnico ed il turismo, come confermato da una numerosa presenza di alberghi, agriturismi e campeggi, soprattutto lungo la

costa. La presenza di turisti è di circa 1.500.000/anno (1.084.462 arrivi e 5.733.226 presenze) ed è concentrata da maggio a settembre, come mostrano i grafici relativi all'area grossetana (Fig. 7).

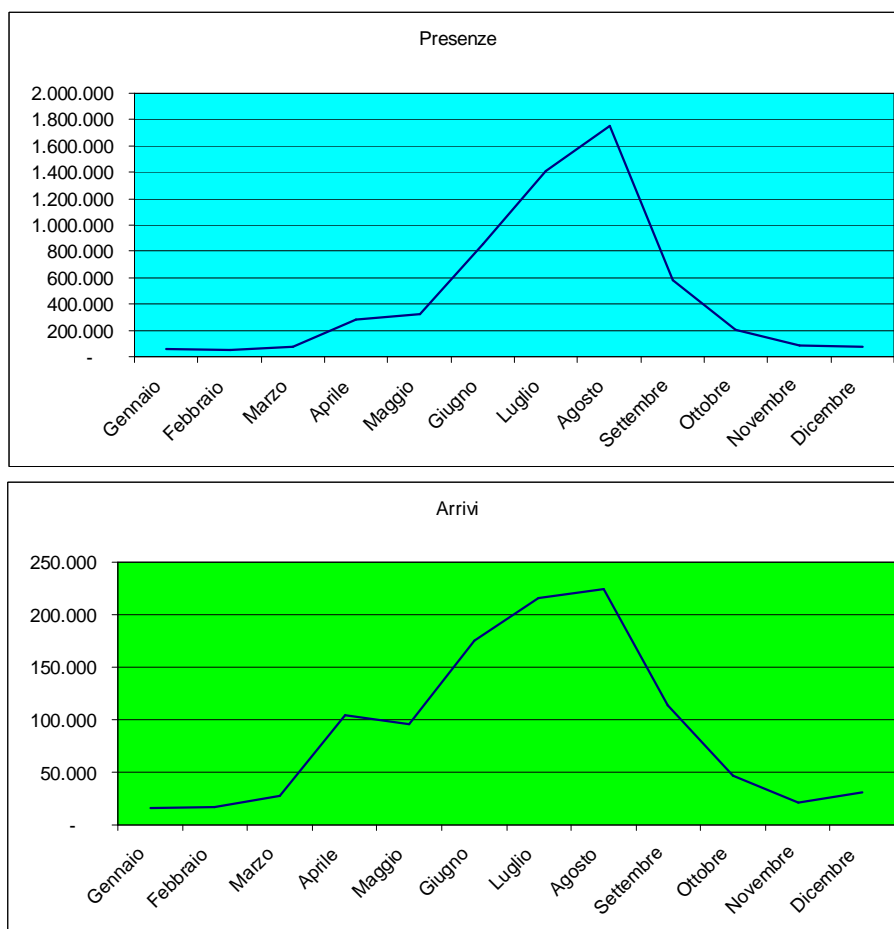


Figura 7. Arrivi e presenze turistiche nel 2006.

Caratteristiche del territorio

Provincia di Grosseto

Il territorio della Provincia di Grosseto presenta una morfologia complessa, che si estende dalle zone pianeggianti costiere, fino ad arrivare agli oltre 1700 m s.l.m. del Monte Amiata (Fig. 8); tra questi estremi si colloca un'estesa serie di formazioni collinari.

Il territorio risulta prevalentemente collinare nelle aree interne, fatta eccezione per isolati rilievi montuosi nella zona delle Colline Metallifere nella parte settentrionale e per il cono vulcanico del Monte Amiata nella

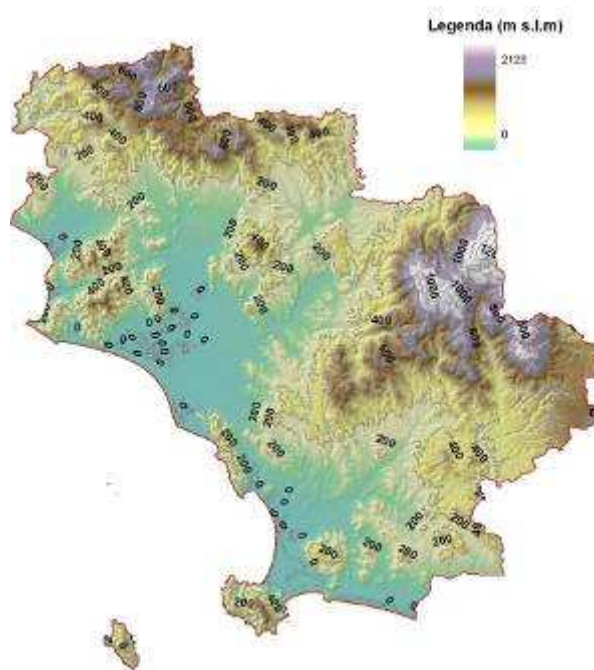


Figura 8. Distribuzione delle altimetrie nella provincia di Grosseto.

parte orientale della provincia. In prossimità della fascia costiera si estende la pianura maremmana, caratterizzata anche da alcune aree umide ed interrotta sporadicamente da isolati promontori, che tende anche ad inoltrarsi nel retroterra, seguendo le basse vallate dei principali corsi d'acqua.

Il principale tratto costiero di pianura della Provincia di Grosseto si estende dalla foce del fiume Bruna a quella dell'Ombrone lungo i circa 16 Km di tombolo. La pianura è delimitata a nordovest dalle colline di Castiglione della Pescaia, ad est dalle colline di Grosseto e a sud dai Monti dell'Uccellina. Seimila anni fa, in corrispondenza della stabilizzazione del livello marino, questa pianura costituiva un ampio golfo nella cui parte settentrionale sfociava il fiume Bruna e in quella ad est il fiume Ombrone. Successivamente, per gli apporti fluviali, specialmente da parte dell'Ombrone, si è verificata una continua progradazione, fino allo stato attuale in cui il Padule della Diaccia Botrona è ciò che rimane dell'antico golfo (Fig. 9). La pianura di Grosseto fa parte del complesso Bacino dell'Ombrone (4.768 Km²), di cui fanno parte quattro sottobacini: Ombrone, Bruna, Albegna ed Osa. L'evoluzione della laguna preistorica è ancora evidente nella parte settentrionale presso Castiglione della Pescaia, in prossimità della foce del Fiume Bruna, dove è presente la palude della Diaccia Botrona, riconosciuta zona umida di valore naturalistico internazionale secondo la Convenzione di *Ramsar* e tutelata come Riserva Naturale Provinciale. L'area paludosa rappresenta una “tessera” rilevante del complesso mosaico delle aree umide costiere, fortunatamente lasciate intatte dalle grandi opere di bonifica che per secoli hanno giocato un importante ruolo nella storia e nello sviluppo della Maremma.



Figura 9. Aree paludose nella pianura di Grosseto: palude della Diaccia Botrona

Un'altra importante area umida è la palude della Trappola situata alla foce del fiume Ombrone, caratterizzata da laghetti salmastri (Stagni della Trappola) la cui origine è da ritenersi legata al progressivo avanzamento del delta del fiume o al formarsi di diramazioni di questo (Fig. 10).

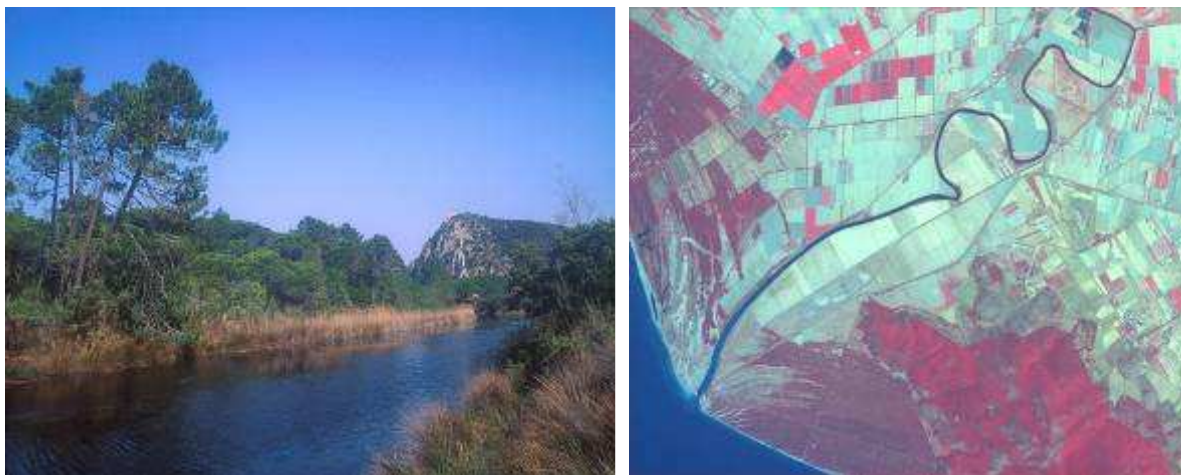


Figura 10. Aree paludose nella pianura di Grosseto: palude della Trappola.

Nel periodo compreso tra 5000-6000 anni fa, la pianura era occupata da un'estesa laguna (Fig. 11). I rilievi di Poggio Terriccio (Castiglione della Pescaia) e dei Monti dell'Uccellina, erano collegati da barriere di sabbia discontinue depositate dalla corrente marina e dal vento. In seguito le barriere si unirono e la laguna si trasformò progressivamente in un lago.

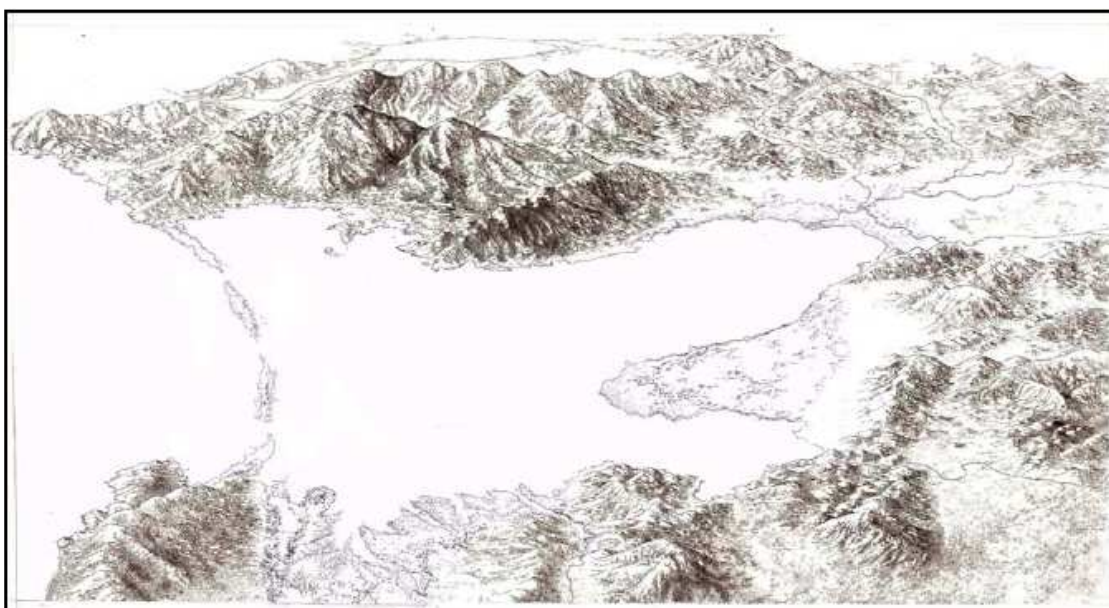


Figura 11. Ricostruzione della piana di Grosseto (Arnoldus-Huyzendveld, 2005).

In accordo con tale evoluzione i dati del sottosuolo indicano che le ghiaie si trovano con maggiore frequenza oltre i 30-40 m di profondità; inoltre, gli strati di ghiaie e sabbie sono più abbondanti e spessi nella parte meridionale della pianura, quella formata dall'Ombrone, mentre nell'area del Bruna e della laguna, la pianura è costituita soprattutto da limi e argille. I maggiori spessori di ghiaie si trovano in corrispondenza dello sbocco dell'Ombrone e fra queste ghiaie possiamo distinguere due livelli principali, che si assottigliano e si approfondiscono procedendo verso il mare

e verso ovest. La distribuzione delle ghiaie alle diverse profondità indica che l'Ombrone si è progressivamente spostato nella pianura, da NO a SE.

L'area costiera della pianura alluvionale di Grosseto presenta la forma di un delta microtidale dominato dal moto ondoso. In quest'area è possibile riconoscere molte dune costiere che identificano la posizione storica della linea di costa a testimonianza dell'avanzamento non regolare del delta (Fig. 12).

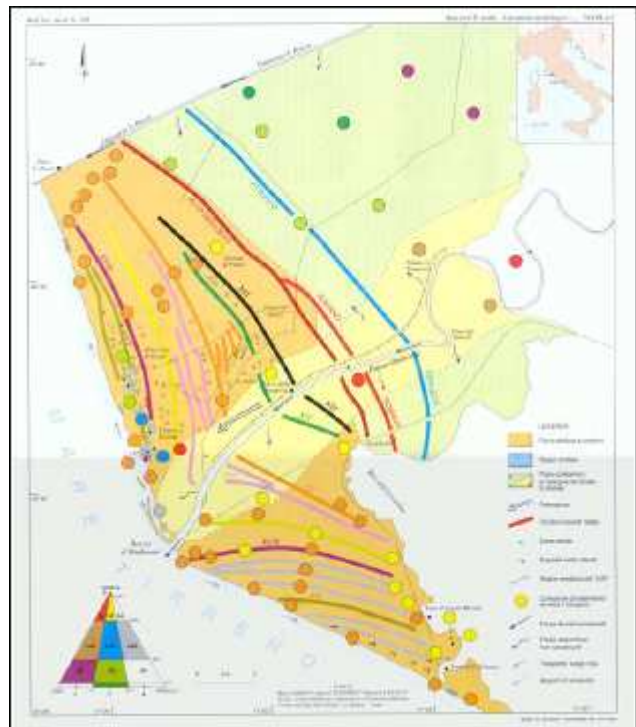


Figura 12. Ricostruzione storica dell'evoluzione della linea di riva (Bellotti *et al.*, 1999).

Il cambiamento nell'uso del suolo (la deforestazione avvenuta durante il Medioevo e il Rinascimento per ampliare le aree destinate all'agricoltura e alla pastorizia) determinò un incremento dell'erosione del suolo e di conseguenza un aumento del trasporto dei sedimenti da parte del fiume, permettendo l'avanzamento del delta. Nel corso dell'ultimo secolo alcune attività antropiche sono cambiate e il processo di bonifica ha profondamente trasformato l'area della pianura costiera, determinando l'arretramento progressivo della prominenza del delta. Questo processo è ancora in atto e la bocca del fiume Ombrone presenta una severa erosione della linea di costa (Innocenti e Pranzini, 1993).

Quindi nella pianura grossetana sono riscontrabili tre tipi principali di ambienti pedogenetici e di suoli distinti in base alla litologia (Fig. 13):

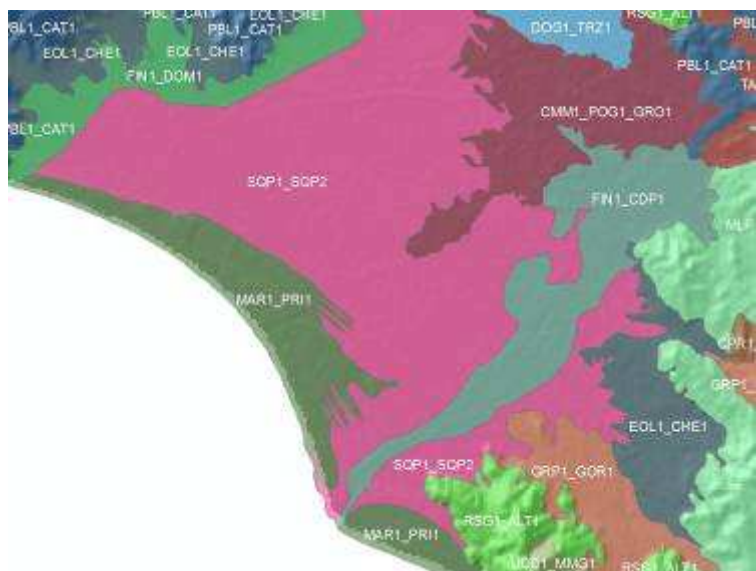


Figura 13. Carta pedologica della pianura grossetana

1. argille e limi di fiume (FIN1_CDP1);
2. depositi sabbiosi costieri (MAR1_PRI1);
3. depositi di bonifica e colmata (SQP1_SQP2).

I dati pedologici per la provincia di Grosseto sono disponibili grazie al Progetto Carta dei Suoli in scala 1:250.000 del Settore Foreste e Patrimonio Agro-forestale della Regione Toscana (<http://sit.lamma.rete.toscana.it/websuoli/>).

Provincia di Viterbo

I processi geologici che hanno interessato la Tuscia laziale hanno lasciato un'impronta indelebile, dando origine ad un paesaggio morfologico ricco di molti elementi: le colline dolci sedimentarie, i ripiani tufacei, i rilievi aguzzi ed aspri delle lave, i laghi craterici o vulcano-tettonici di forma circolare o composta da più circonferenze che si intersecano sovrapponendosi, le forre e i corsi d'acqua a carattere torrentizio (Fig. 14).

L'idrografia della Tuscia laziale è caratterizzata dalla presenza di una fitta rete di corsi d'acqua, quasi tutti a carattere prevalentemente torrentizio, che confluiscono nei due fiumi principali, il Mignone e il Marta che hanno scavato e modellato questo territorio.



Figura 14. Paesaggi tipici della Tuscia laziale.

La geologia della provincia di Viterbo è caratterizzata principalmente da formazioni dovute all'attività di tre importanti complessi vulcanici: quello Vulsino, quello Vicano, e quello Cimino (Fig.15).

Il territorio può essere schematizzato in tre fasce:

- occidentale, la Maremma, in cui si rinvencono in larga maggioranza formazioni di tipo sedimentario, con argille, sabbie, conglomerati, depositate in corrispondenza dei grandi cicli marini del Pliocene e del Pleistocene (tra 5 e 0,6 milioni di anni fa);

- orientale, sulla sponda destra del Tevere, caratterizzata da argille e sabbie marine in successione verticale, di età Pliocenica, in parte ricoperte da conglomerati e travertini di origine continentale e di età Pleistocenica;
- centrale, notevolmente più ampia delle precedenti, in cui si manifestano le formazioni vulcaniche, ignimbriti, lave, tufi e piroclastici.



Figura 15. La provincia di Viterbo

La storia geologica della Tuscia è strettamente legata alle manifestazioni vulcaniche del Pleistocene, tanto che gran parte del suo territorio risulta occupato da estesi depositi di piroclastiti più o meno coerenti (Fig. 16 e 17). Questa formazione litologica, nel tempo, ha permesso lo sviluppo, in vasti settori del comprensorio, di suoli caratteristici per lo più brunastri e ricchi di elementi nutritivi come l'ossido

Legenda Geolitologica

- Alluvioni lacustri
- Travertini
- Argille e argille sabbiose mio-plio-pleistoceni
- Flisch cretacico-oligoceni
- Alluvioni fluviali, depositi Quaternari costieri
- Sabbie, conglomerati e calcareniti plio-pleisto
- Ignimbrite quarzolitica cimina "Peperino tipi
- Piroclastiti, ignimbriti, scorie e lapilli
- Lave
- Depositi vulcano-sedimentari
- Calcari e filladi mesozoici

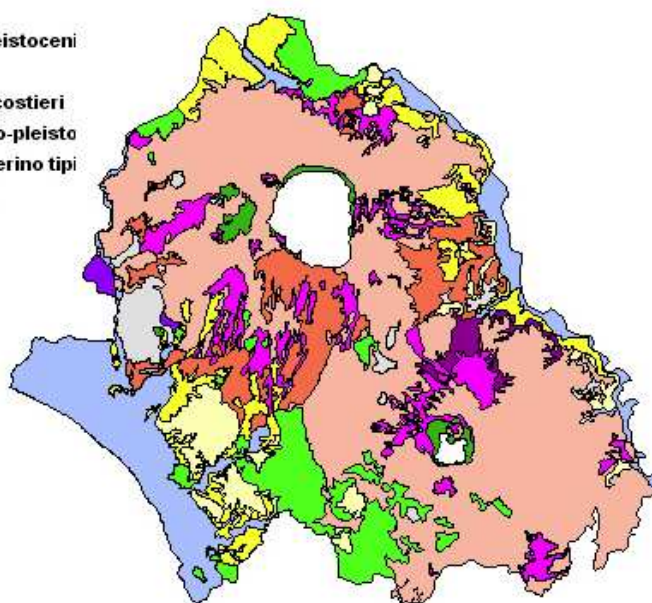


Figura 16. Carta geologica della provincia di Viterbo.

di potassio, l'anidride fosforica e l'ossido di calcio. Tali substrati pedologici hanno uno spessore in genere minimo su formazioni più compatte e cementate, come i tufi litoidi e il peperino, massimo sulle rocce più porose e permeabili come la pozzolana e il tufo rosso. Anche il loro scheletro presenta discrete differenze: sui tufi sciolti è mediamente ricco di argilla, mentre su rocce più consistenti non mancano suoli sabbiosi i quali, a causa della loro maggiore permeabilità, soffrono spesso di aridità durante la stagione estiva.

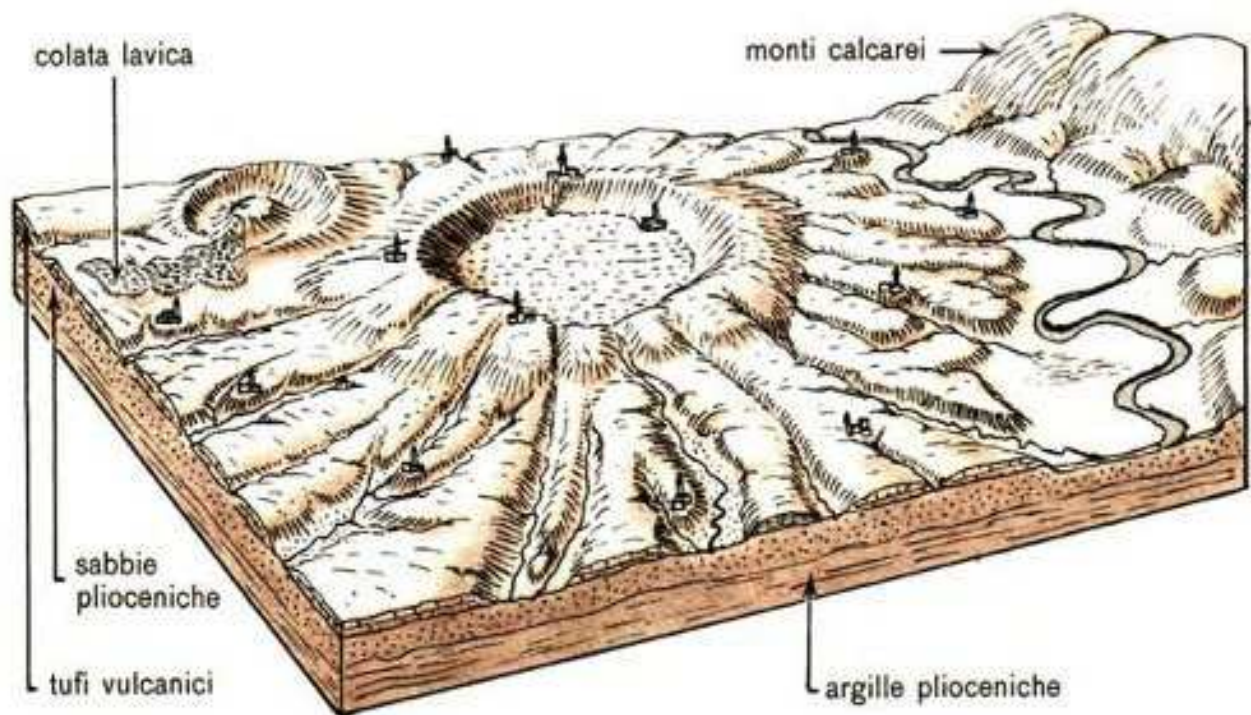


Figura 17. Paesaggio geologico della provincia di Viterbo.

Il clima

Provincia di Grosseto

L'elevata eterogeneità e complessità morfologica del territorio della provincia di Grosseto determinano l'instaurarsi di condizioni microclimatiche diverse in aree anche non molto distanti tra loro. Il clima varia prevalentemente in relazione alla distanza dal mare e all'altitudine: in linea generale, infatti, man mano che ci si allontana dalla costa, si accentuano le escursioni termiche e aumenta la piovosità primaverile-estiva, mentre con l'altitudine diminuiscono le temperature, sia minime che massime, e aumenta la piovosità.

Le temperature minime medie di gennaio, il mese più freddo, variano tra i -2 °C dell'area intorno al Monte Amiata e i 3 °C della costa e delle isole; in luglio e agosto, i mesi più caldi, i valori massimi risultano compresi tra i 21 °C sulla vetta del Monte Amiata e i 31 °C lungo la fascia costiera e nelle pianure interne (DesertNet, 2005).

Le precipitazioni, concentrate soprattutto nei mesi autunnali e nel periodo di transizione tra inverno e primavera, si aggirano mediamente¹ attorno agli 850 mm annui, ma con forti variazioni (Fig. 18): i valori medi sulle isole e nella zona dei Monti dell'Uccellina e dell'Argentario sono inferiori a 650 mm annui; lungo la restante fascia costiera e nelle pianure corrispondenti i valori sono inferiori agli 800 mm annui, mentre man mano che si procede verso l'interno i valori tendono ad aumentare fino a toccare e superare i 1000 mm annui nella zona pedemontana del Monte Amiata e sui rilievi più elevati delle Colline Metallifere. Sull'Amiata i valori medi superano i 1200 mm annui.

Lungo la fascia costiera e nella relativa area pianeggiante sono molto frequenti prolungati episodi siccitosi che negli ultimi anni stanno causando una vera e propria condizione di aridità. L'area prossima alla fascia costiera è da annoverare, infatti, tra le zone italiane a rischio desertificazione (DesertNet, 2005).

In base ai parametri climatici, si possono individuare in questa area quattro fasce geografico-altitudinali:

1. fascia costiera, distribuita dalle coste alle colline prospicienti il mare, attraverso la Pianura Maremmana.
2. fascia collinare, distribuita nell'entroterra collinare dal livello del mare fino ai 600 m di altitudine;
3. fascia submontana, distribuita nelle alture comprese tra i 600 e i 1100 m;
4. fascia montana, distribuita a quote superiori ai 1100 m.

Fascia costiera

Il clima della costa è di tipo mediterraneo, caratterizzato da estate calda e secca, autunno mite e con un'elevata piovosità, inverno non molto freddo e scarsamente piovoso, primavera mite e con una piovosità abbastanza consistente, ma comunque inferiore a quella autunnale (Fig. 19). Una caratteristica peculiare di alcune zone della fascia costiera grossetana è la presenza di limitate aree

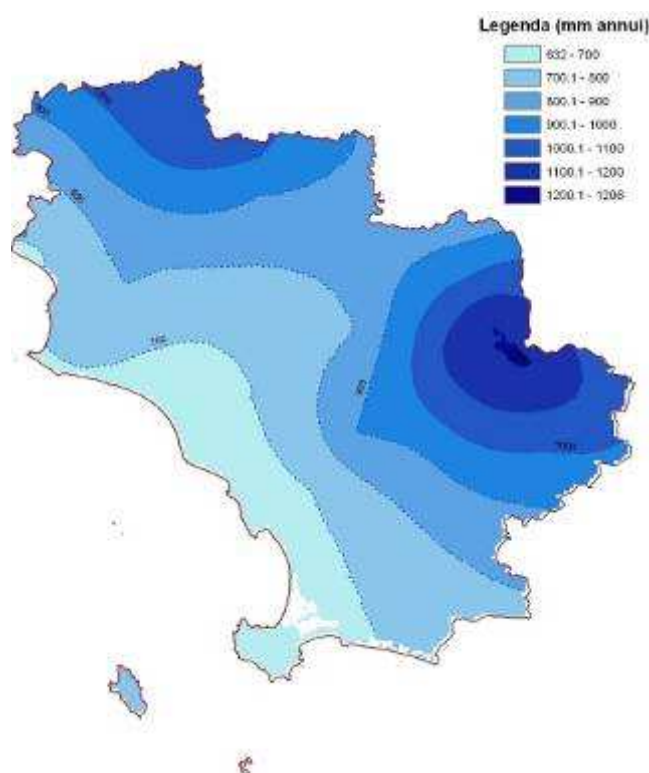


Figura 18. Precipitazioni medie annue.

¹ Le medie sono relative al trentennio di riferimento standard per il WMO (*World Meteorological Organization*) 1961–1990.

paludose, con acquitrini permanenti o temporanei, residue della passata condizione della Maremma, ormai radicalmente bonificata e coltivata.

La lecceta rappresenta la formazione boschiva più frequente in quest'area. Ad essa si accompagna una macchia composta prevalentemente da ericacee, la sughera e tra la fascia costiera e le retrostanti pianure agricole la caratteristica pineta.

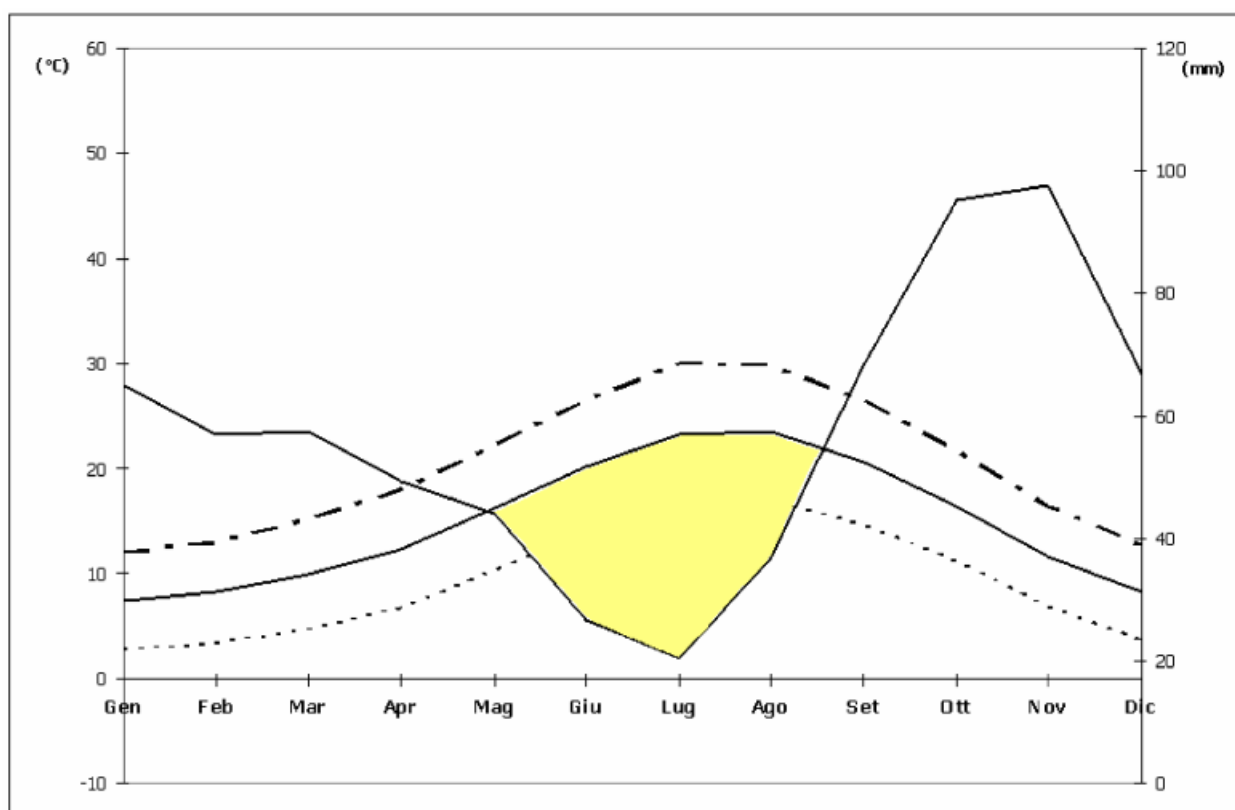


Figura 19. Diagramma termo-pluviometrico della fascia costiera.

Fascia collinare e submontana

Spostandosi dalla costa verso le zone più interne e altimetricamente più elevate, le variazioni climatiche che si riscontrano riguardano prevalentemente le differenze stagionali delle temperature che diventano più marcate e la piovosità che aumenta, rimanendo però abbastanza concentrata nei periodi autunnale e primaverile.

La vegetazione è prevalentemente costituita da latifoglie (leccio, quercia, faggio, cerro, castagno) e conifere (cipresso, pino).

Fascia montana

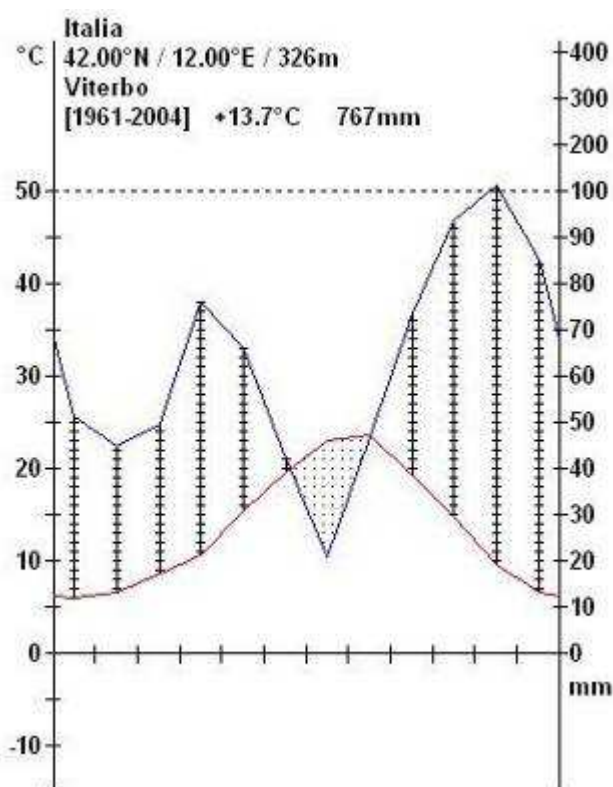
L'unica zona che si eleva oltre i 1100 m s.l.m. è il Monte Amiata, la cui cima tocca i 1738 metri di altezza. Con l'altitudine si accentua la durata e la rigidità della stagione invernale e si registra un complessivo aumento della piovosità, anche primaverile-estiva.

La vegetazione è costituita da faggete e conifere.

Provincia di Viterbo

I dati meteorologici della Provincia di Viterbo sono stati forniti dall'Ufficio Idrografico di Roma (ora Centro Funzionale della Regione Lazio). Dal punto di vista climatico la provincia di Viterbo presenta affinità con i territori limitrofi della Toscana meridionale dove, in genere, le scarse precipitazioni vengono compensate dall'elevata ritenzione idrica dei suoli. Inoltre tutta la Tuscia è influenzata dalle correnti umide del Mar Tirreno da cui deriva una generale caratterizzazione del clima in senso oceanico, fattore importante per le caratteristiche della flora e della vegetazione spontanea della Provincia.

Dal punto di vista fitoclimatico, procedendo dalla costa verso l'interno, si assiste al passaggio dalla regione mediterranea a quella temperata; in particolare, si passa dal termotipo mesomediterraneo



inferiore con ombrotipo piuttosto secco di Montalto di Castro e Tarquinia, fino al termotipo montano inferiore con ombrotipo umido, che caratterizza esclusivamente l'area dei Monti Cimini, attraverso aspetti di transizione che rientrano ora nella regione mediterranea ora in quella temperata.

I dati riguardanti le precipitazioni e le temperature relativi alla stazione termopluviometrica di Viterbo si riferiscono al periodo 1961-2004 (Fig. 20); questi evidenziano come la precipitazione media annuale sia pari a 767 mm con un periodo autunnale più piovoso con valori che raggiungono i 115,36 mm a novembre, mentre a luglio si registra la maggiore siccità (20,87mm).

Figura 20. Diagramma termo-pluviometrico della stazione di Viterbo.

Le temperature medie annue sono di 13,76°C, con temperature medie minime che si registrano il mese di gennaio (6,05°C) e le massime nel mese di agosto (23,76°C). Le temperature minime assolute sono anch'esse in gennaio (- 4°C) e le massime ad agosto (35°C). Vi è un'aridità estiva debole a luglio, agosto e sporadicamente a giugno e il freddo è prolungato da ottobre a maggio.

Le correnti umide del mar Tirreno caratterizzano il clima, influenzando in gran parte le tipologie della vegetazione spontanea della provincia. Dalla zona costiera verso l'interno si verifica il passaggio dalla regione mediterranea a quella temperata attraversando aspetti di transizione che rientrano sia nella regione mediterranea che in quella temperata. Si passa cioè da una zona più calda e asciutta della fascia costiera ad un clima decisamente più fresco e umido delle aree collinari e montane interne. A conferma di ciò vengono riportati i diagrammi termo-pluviometrici di due località, una costiera, Tarquinia, ed una pedemontana sul M. Cimino, Soriano (Fig. 21). La prima località, nella Regione Mediterranea, è caratterizzata da precipitazioni scarse (593 mm - 811 mm) e da temperature medie di 15,5°C. L'aridità è intensa da maggio ad agosto con valori non elevati ad aprile. Verso l'interno, nella zona a ridosso del M. Cimino, si passa alla zona temperata in cui si hanno precipitazioni abbondanti con aridità assente o molto debole e temperature medie intorno ai 13 °C; durante l'inverno le temperature basse si prolungano da ottobre a maggio.

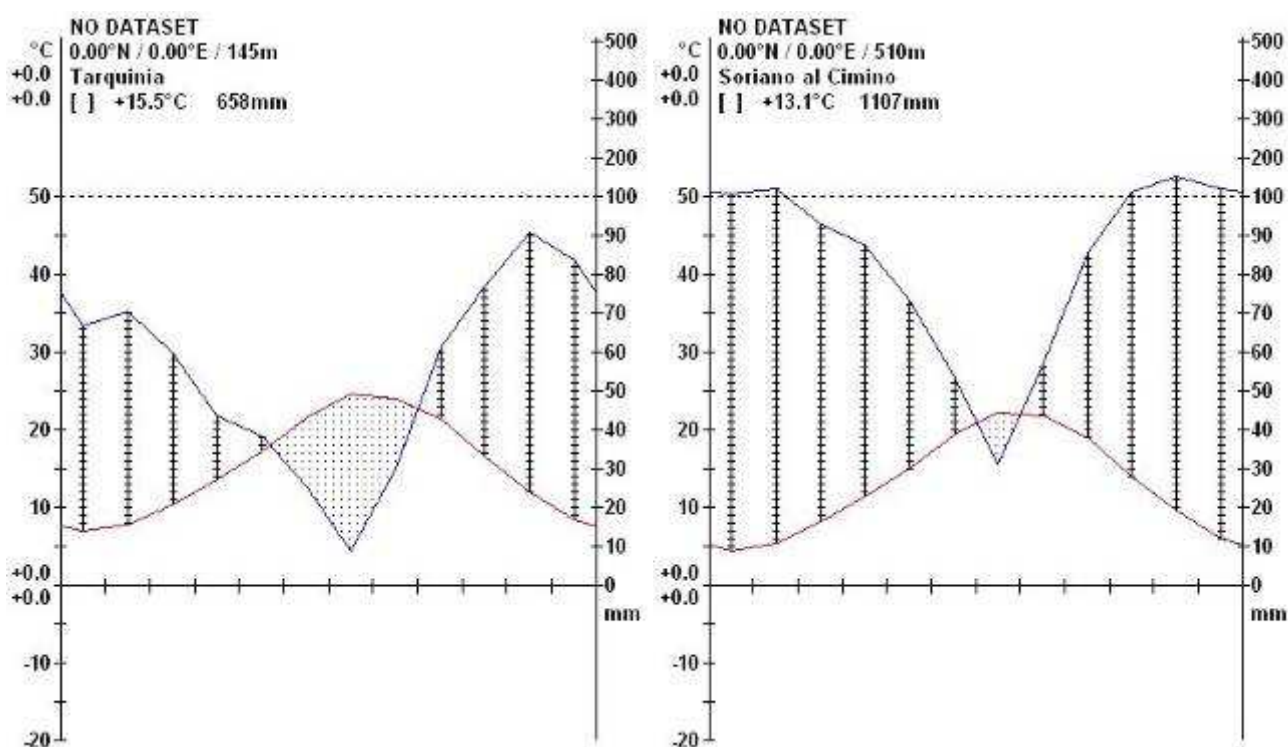


Figura 21. Diagramma termo-pluviometrico della stazione di Tarquinia (a sinistra) e della stazione di Soriano al Cimino (a destra).

Siti di campionamento

Nell'area di studio sono stati individuati 11 siti di raccolta, georeferenziati e selezionati in base alla posizione e alle caratteristiche ecologiche (Fig. 22). Tutti i siti sono caratterizzati dalla presenza di un allevamento zootecnico, più o meno esteso, e dai limitrofi potenziali focolai larvali, rappresentati da tutte le raccolte d'acqua (risaie, canali irrigui e di drenaggio, anse di fiumi e torrenti), presenti nel raggio di 500 m.

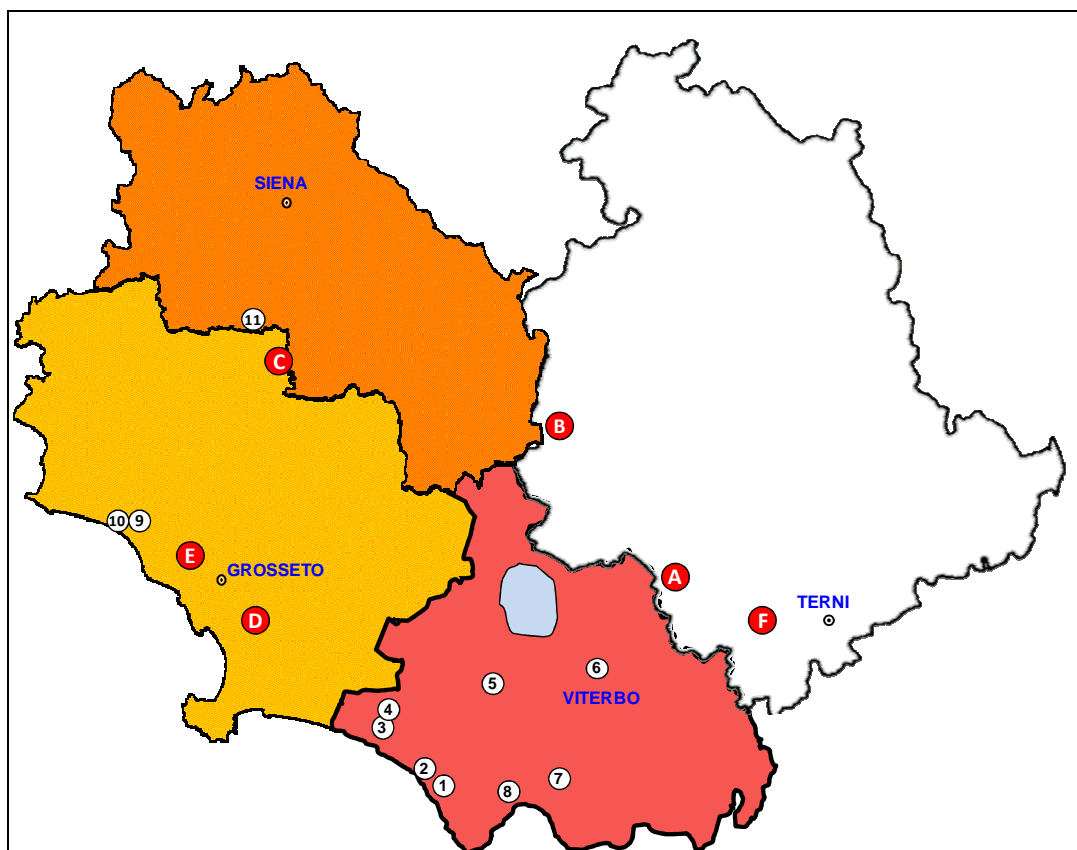


Figura 22. Siti selezionati nell'area di studio: 1-11, indagini entomologiche longitudinali; A-F, indagini occasionali.

Di seguito l'elenco dei siti monitorati:

Sito 1 - Tarquinia (VT), loc. Forca di Parma, Azienda zootecnica di Tombini (42°17'88"N, 11°42'89"E) caratterizzata dall'allevamento di bovini, bufali, ovini e caprini per la produzione di latte e prodotti caseari.

Sito 2 - Tarquinia (VT), loc. Valfragida, Azienda agricola-zootecnica di Stefanelli (42°18'26''N, 11°39'27''E) caratterizzata dall'allevamento di bovini per la produzione di latte e prodotti

caseari e da un'estensiva coltivazione di pomodori (2005), che è stata poi sostituita dal grano (2006-2009).

- Sito 3** - Montalto di Castro (VT), Tenuta La Parrina di Pasqualini (42°19'20"N, 11°38'48"E), azienda caratterizzata dall'allevamento di ovini e caprini per la produzione di latte e prodotti caseari.
- Sito 4** - Montalto di Castro (VT), loc. Campo Morto, Azienda agricolo-zootecnica di Simoni (42°20'64"N, 11°38'30"E) caratterizzata da un piccolo allevamento di suini, conigli e pollame.
- Sito 5** - Tuscania (VT), loc. Pantacciano, Azienda agricola di Riccioni (42°25'46"N, 11°55'08"E) caratterizzata dall'allevamento di ovini per la produzione di latte e prodotti caseari e da un'estensiva coltivazione di tabacco.
- Sito 6** - Viterbo: Azienda agricolo-zootecnica di Gibellini (42°28'00"N, 12°06'98"E) caratterizzata dall'allevamento di bovini per la produzione di latte e prodotti caseari e da suini, ma solo per il 2007.
- Sito 7** - Monteromano (VT), loc. Civitella Cesi, Azienda zootecnica di Cherchi (42°15'28"N, 11°58'22"E) caratterizzata dall'allevamento di ovini per la produzione di latte e prodotti caseari.
- Sito 8** - Monteromano (VT), loc. La Turchina, Azienda zootecnica di Micozzi (42°14'31"N, 11°52'02"E), caratterizzata dall'allevamento di ovini per la produzione di latte e prodotti caseari.
- Sito 9** – Grosseto, loc. Principina, Azienda zootecnica di Berni (42°43'29''N, 11°02'28''E); questo sito è caratterizzato dall'allevamento di ovini per la produzione di latte e prodotti caseari e da suini e cavalli, e nelle vicinanze dalla presenza di vaste risaie (250 ha).
- Sito 10** – Grosseto, loc. Ampio, Maneggio di Raffi (42°47'30''N, 10°56'51''E); sito localizzato più internamente nella provincia in cui si custodiscono cavalli di pregio, impiegati in manifestazioni ippiche. Nelle vicinanze il paesaggio è caratterizzato da coltivazioni estensive di girasoli e mais. Questo sito è stato scelto perché nelle sue vicinanze, nel 1997, avvenne il primo caso di malaria autoctona in Italia dall'eradicazione.
- Sito 11** – Siena loc. Val di Merse, Azienda agricolo-zootecnica di Angiolini (43°09'11''N, 11°17'18''E), localizzata lungo il margine nord-orientale della Maremma, in una zona collinare (300-400 m s.l.m.), considerata il presunto limite nord dell'areale di *An. labranchiae* in Italia. Il sito è caratterizzato dall'allevamento di suini e dalla presenza di risaie (70 ha) e campi di mais.

Inoltre sporadiche indagini entomologiche sono state effettuate negli anni per valutare l'estensione degli areali delle diverse specie anofeliche e, successivamente, per validare e testare i modelli statistici e le mappe di rischio (siti A-F) (Fig. 20):

A) Alviano (42°35'0"N 12°18'0"E) e **B)** Fabro (42°52'0"N 12°01'0"E), (TR), settembre 2003: sono due località collinari in provincia di Terni, la prima posta a 251 m s.l.m. nelle vicinanze dell'omonimo lago artificiale, la seconda a 364 m s.l.m..

C) Cinigiano (42°53'28"N 11°23'33"E) e la frazione di Casenovole (43°02'0"N 11°19'57"E) (GR), luglio 2006: due località collinari poste lungo il pendio di Monte Antico.

D) San Donato (GR) (43°42'10"N 10°47'15"E), luglio 2007: questa è un'area di coltivazione estensiva del riso, a circa 30 km a sud di Grosseto, nota per essere un sito di ricolonizzazione e riproduzione massiva di *An. labranchiae* in Maremma. Dal 2003 il numero di risaie è andato progressivamente riducendosi, poiché il riso è stato sostituito da altre colture. Attualmente anche molte fattorie stanno modificando parzialmente o completamente la loro vocazione in agriturismi.

E) Parco dell'Uccellina, Alberese (GR) (42° 40'67''N; 11°06'22''E), luglio 2007: questo parco è caratterizzato da una catena di boschive colline che corre parallela ad una striscia di costa sabbiosa. Il parco include diversi tipi di biotopi, quali la foce del fiume Ombrone, le paludi della Trappola, una pineta retrodunale e ampi pascoli utilizzati sia da erbivori selvatici che da mandrie di bovini allevati allo stato brado.

F) Borgheria (TR) (42°29'02"N 12°31'48"E), frazione di Narni, settembre 2008: località umbra posta a 240 m s.l.m..

Sito 9 Grosseto, loc. Principina (GR), Azienda zootecnica di Berni (42°43'29''N, 11°02'28''E); in questo stesso sito in cui è stata condotta un'indagine entomologica nel biennio 2005-2006, sono state effettuate raccolte sporadiche nel luglio 2007, nel settembre 2008 e nel settembre 2009.

ATTIVITÀ DI CAMPO

Per studiare le fluttuazioni stagionali e la densità delle specie anofeliche, sono state condotte due indagini entomologiche longitudinali, con raccolta di adulti e larve di zanzare. La prima si è svolta nel biennio 2005-2006, con catture quindicinali da aprile ad ottobre, nei siti della Maremma toscana (siti 9, 10 e 11) e in un sito in Maremma laziale (sito 2); la seconda indagine è stata condotta, mensilmente, nei siti della Maremma laziale (siti 1-8), durante il periodo aprile-ottobre del 2007-2008.

Metodi di cattura

Le zanzare sono state catturate attivamente ed in modo esaustivo in ogni sito, durante le prime ore del giorno (dalle ore 7:00 alle ore 10:00), utilizzando sia aspiratori a bocca che elettrici (Fig. 23). Le catture sono state effettuate in ricoveri animali (stalle, porcilaie, conigliere, pollai etc.), locali frequentati dall'uomo (locali per il rimessaggio di macchine e strumenti da lavoro), ed ambienti "misti" (locali per la mungitura, fienili). In zone precedentemente selezionate sulla base delle abitudini trofiche delle zanzare adulte, sono state posizionate trappole CDC, attivate con anidride carbonica e/o luce, e lasciate operare per almeno una notte (Fig. 23). Sono state condotte catture mensili su uomo, tra giugno e settembre, dalle ore 20:00 alle ore 2:00, da due coppie di persone nei siti 2, 9, 10 e 11 nel 2005, e nei siti 9 e 11 nel 2006.

Per prelevare campioni di larve nei focolai larvali si è utilizzato un pescalarve da 250 ml (Fig. 23). Nelle risaie sono state effettuate 100 pesche lungo l'intero perimetro (400-600 m e circa 2 ha di superficie), mentre torrenti, canali irrigui e di drenaggio

sono stati campionati con 10-20 pesche, a seconda della dimensione del corpo d'acqua.



Fig. 23. Trappola CDC; aspiratore elettrico; campionamento di larve.

Conservazione dei campioni

Dopo ogni raccolta, larve e pupe sono state mantenute in laboratorio, in armadi termostatati, fino allo sfarfallamento, mentre un campione è stato conservato in alcool al 70%. Tutti gli adulti, sia quelli sfarfallati in laboratorio che quelli raccolti sul campo, sono stati uccisi e conservati in congelatore a -20°C per le successive analisi.

ANALISI STATISTICA

Le differenze tra i siti, negli anni, sono state valutate con il test di Kruskal-Wallis, mentre il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per calcolare le differenze in ciascun sito negli anni. La parità e le catture su uomo sono state analizzate rispettivamente con l'analisi del χ^2 e con il χ^2 test for trend. Tutti i test statistici applicati sono stati considerati significativi con una probabilità di $\alpha=0.05$. Per le analisi statistiche è stato utilizzato EpiCalc 2000 v. 1.02 e il software GraphPad PRISM v.3.02.

ATTIVITA' DI LABORATORIO

Identificazione morfologica e molecolare

Le zanzare, adulti e larve, sono state identificate utilizzando chiavi morfologiche specifiche (Rioux 1958, Romi *et al.* 1997a). Dopo ogni raccolta, una percentuale di femmine gravide del complesso *An. maculipennis* è stata indotta a deporre per l'identificazione di specie, basata sull'ornamentazione dell'esocorion delle uova (Angelucci, 1955).

La maggior parte degli esemplari del complesso *An. maculipennis* (compresi tutti quelli usati per valutare il tasso di parità, l'attività trofica e le preferenze alimentari), sono stati processati molecolarmente per l'identificazione di specie utilizzando una Multiplex PCR (Proft *et al.* 1999) (Fig. 24).

Per valutare la presenza di eterogeneità intraspecifica e confermare i risultati delle Multiplex PCR, un campione casuale proveniente da ciascun sito e per ciascun anno di raccolta è stato analizzato attraverso il sequenziamento dell'ITS2 (Collins e Paskewitz 1996, Marinucci *et al.*, 1999), metodo impiegato anche per distinguere le specie gemelle *Anopheles claviger* ed *Anopheles petragnani*. I prodotti di PCR sono stati purificati usando il kit Microcon-PCR (Millipore) e direttamente sequenziati presso la MWG Biotech AG (Ebersberg, Germany). Gli allineamenti tra sequenze omologhe disponibili in GenBank (AY232827, AY238424, AY238425, AY238408, Z50103) e quelle generate dal presente studio sono state analizzate utilizzando il software DS Gene v1.5 (Accelrys Inc. 2003).

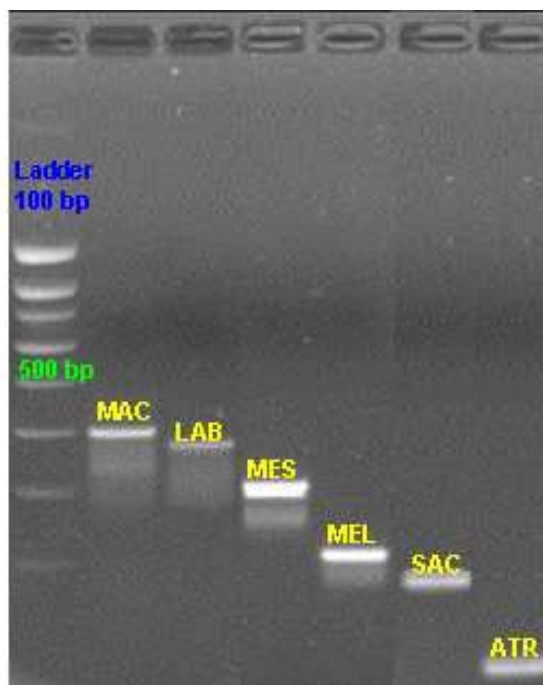


Figura 24. Pattern di bandeggio per la diagnosi di specie per il complesso *maculipennis*.

(MAC: *An. maculipennis* ss; LAB: *An. labranchiae*; MES: *An. messeae*; MEL: *An. melanoon*; SAC: *An. sacharovi*; ATR: *An. atroparvus*).

Analisi delle preferenze alimentari

Per stabilire l'origine del pasto di sangue e identificare quindi gli ospiti sui quali le zanzare si erano alimentate, sono state impiegate due diverse metodiche. Nella prima, il contenuto dello stomaco di femmine replete, raccolte nel biennio 2005-2006, è stato strisciato su carta da filtro e successivamente si è proceduto all'analisi ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) secondo il protocollo impiegato da Bongiorno *et al.*, 2003. Per un secondo pool di esemplari, raccolti nel

biennio 2007-2008, è stata progettata e messa a punto una diagnosi rapida basata su una Multiplex-PCR. Come marcatore molecolare è stato scelto il gene per la Citocromo b (cytb), una proteina transmembrana ben caratterizzata, appartenente al complesso III del sistema di fosforilazione ossidativa e la sola proteina del complesso codificata dal genoma mitocondriale (Hatefi 1985; Irwin *et al.*, 1991). Il gene per la cytb è caratterizzato da un alto numero di copie e da una sufficiente variabilità genetica a livello di sequenza primaria all'interno del taxon dei Vertebrati e per questo ampiamente utilizzato in studi evolutivi (Kent e Norris, 2005). Sono state utilizzate sequenze della cytb dell'uomo (europeo, asiatico, africano) e dei principali animali domestici presenti nell'area di studio (pecora, capra, mucca, bufalo, cavallo, asino, coniglio, cane, gatto, ratto, maiale e diverse specie di volatili da cortile) depositate in GenBank. Queste sequenze sono state allineate per costruire un primer universale, un set di 12 primer specie-specifici per i mammiferi e un primer classe-specifico per gli uccelli (Tab. 3) che permettessero di ottenere prodotti di amplificazione di dimensione diagnostica per ciascun ospite vertebrato. Inoltre è stata condotta una ricerca con Blast per escludere una possibile compatibilità di ciascun primer con la sequenza di altri animali domestici o selvatici, potenzialmente presenti nell'area di studio (Tab. 4).

ID	primer	5' – 3'	T _m	T _{ann ottimale}	lunghezza
	for_Univ	GRGGHCAAATRTCNTTYTGRGG			
1	goat_rev	TGCTAGCTGCTGGTATTATT	48.37	53.17	708
2	dog1_rev	TGAAATATAAGATTGAAGCGAC	46.73	52.55	675
3	cat_rev	GATGGTGATGAACGGATGTTCTACA	54.98	55.66	647
4	horse_rev	TTAGTGTCAGTAAGTCTGCCA	50.45	54.95	603
5	donkey_rev	CTGCTACTAAGAGTCAGAACAC	50.24	54.51	588
6	rabbit_rev	AGAATAGGACTTGRCTAATGGG	48.77	52.96	573
7	buffalo_rev	GAATGGCCGGAACATCATA	49.29	53.91	557
8	pig_rev	GTGTGTAGTATGGGCATTAAAAT	49.16	53.07	523
9	man_rev	GAGGATGGATAGTAATAGGGCA	50.31	54.82	494
10	dog2_rev	CTAATAGGTCAGGTGAAAATAAA	46.08	51.46	348
11	cow_rev	AGAGCTAGAATTAGTAAGAGGG	48.00	52.39	313
12	bird_rev	TGCCTAGNGGRTTRTTTGAG	53.67	55.19	228
13	sheep_rev	CTGCGATGATGAATGGGAAAA	51.16	50.83	168
14	rat_rev	TTRGGRATGGAGCGTAGAATA	50.61	53.37	454

(B=C,G,T; D=A,G,T; H=A,C,T; K=G,T; M=A,C ; N=A,C,T,G ; R=A,G; S=C,G; V=A,C,G; W=A,T; Y=C,T).

Tabella 3. Elenco dei primer messi a punto per l'analisi dei pasti di sangue.

ID	Specie
1	<i>Capra spp.</i>
2	<i>Canis familiaris</i>
3	<i>Felis spp.</i>
4	<i>Equus caballus</i> e <i>E. przewalskii</i>
5	<i>Equus asinus</i>
6	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
7	<i>Bubalus bubalis</i>
8	<i>Sus scrofa</i>
9	<i>Homo sapiens</i>
10	<i>Canis lupus lupus</i> e <i>C. l. familiaris</i>
11	<i>Bos spp.</i>
12	Classes Aves
13	<i>Ovis spp.</i>
14	<i>Rattus spp.</i>

Tabella 4. specificità dei primer reverse dopo analisi con Blast.

Il DNA totale è stato estratto da campioni di sangue in ciascun animale incluso nel saggio diagnostico (DNA di riferimento); inoltre parte di questo sangue è stato utilizzato per nutrire artificialmente alcune specie di zanzare di laboratorio (*Anopheles stephensi*, *Aedes albopictus* e *Aedes aegypti*, mantenute presso l'insettario dell'Istituto Superiore di Sanità) che hanno rappresentato il controllo positivo del saggio. La PCR è stata quindi messa a punto sui campioni di DNA di riferimento e sui DNA estratti dai controlli positivi (zanzare col pasto di sangue) e negativi (zanzare senza pasto di sangue). La PCR prevede una denaturazione iniziale a 94 °C per 5 minuti; seguita da un ciclo, ripetuto 30 volte, di denaturazione a 94 °C per 30 secondi, dall'*annealing* a 50°C per 1 minuto e dalla polimerizzazione a 72°C per 30 secondi; infine l'estensione finale a 72°C per 7 minuti. I prodotti di PCR sono stati discriminati dopo elettroforesi su gel di agarosio all'1.8% e colorazione con bromuro di etidio (Fig. 25).



Figura 25. Multiplex-PCR: pattern di bande specie-specifiche.

Per identificare successivamente alcune specie di uccelli da cortile, i prodotti di PCR amplificati da sangue di uccello sono stati digeriti utilizzando l'enzima di restrizione *HphI* (sito di taglio 5'-G G T G A[N]8[^]-3') che ha prodotto specifici pattern di frammenti (Tab. 5).

faraona/pavone	pollo	anatra	oca	tacchino
228	179	164	138	115
	49	64	64	113
			26	

Tabella 5. Dimensione (in bp) delle bande ottenute dopo digestione con *HphI* dei prodotti di PCR da sangue di uccello.

Caratterizzazione ultrastrutturale di annessi dell'apparato riproduttore femminile

Per caratterizzare a livello ultrastrutturale la spermateca e la ghiandola accessoria dell'apparato riproduttore femminile delle specie anofeliche e mettere in relazione alcuni eventi fisiologici con certi aspetti morfologici, sono stati condotti studi comparativi su *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s.s. e su *An. stephensi*, specie di riferimento quest'ultima mantenuta in allevamento nell'insettario dell'Istituto Superiore di Sanità.

Microscopio ottico (LM)

Per l'analisi al LM, sono state dissezionate le ghiandole accessorie e le spermateche da campioni di 10 femmine di *An. labranchiae* ai diversi stadi del ciclo gonotrofico (*engorged*, *half-gravid*, *gravid* e *after-oviposition*), associati alla digestione del pasto di sangue e, quindi, alla maturazione delle uova. Per *An. maculipennis* s.s. e *An. stephensi* le ghiandole sono state prelevate da campioni di 10 femmine *half-gravid*.

Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Per l'analisi al TEM, da un campione di 10 femmine *half-gravid* di *An labranchiae* sono state rimosse le ghiandole accessorie e fissate per 1 ora a 4°C in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7,2, contenente paraformaldeide al 4% e glutaraldeide al 5% (Karnovsky, 1965). Le ghiandole sono state immerse overnight nel tampone cacodilato, quindi fissate in tetrossido di osmio all'1% per 1 ora, disidratate in etanolo a concentrazione crescente e incluse in resina epossidica. Successivamente si è proceduto al taglio (con microtomo Reichert Ultracut per le sezioni sottili e con l'ultramicrotomo LKB Nova per le sezioni ultrasottili), alla colorazione con acetato di uranile e citrato di piombo, e all'esame dei campioni con il microscopio elettronico a trasmissione 1200 Jeol EX II.

Microscopio elettronico a scansione (SEM)

Per l'analisi al SEM, le ghiandole accessorie e le spermateche di 10 femmine *half-gravid* di *An. labranchiae*, *An. maculipennis* s.s. e *An. stephensi* sono state fissate e disidratate, seguendo le procedure precedentemente descritte. Il materiale è stato disidratato attraverso il metodo del *critical point dry* con l'uso di CO₂ liquida in un apparato Balzers CPD 020. I campioni sono poi stati montati su speciali porta-campioni, metallizzati con oro usando un metallizzatore Balzers Union MED 010 ed osservato al microscopio elettronico 5200 Jeol JSM

VALUTAZIONE DEGLI INDICI EPIDEMIOLOGICI

Per la valutazione del Potenziale Malariogenico dell'area di studio (cioè il rischio di reintroduzione della malaria in quell'area), e dei 3 parametri che lo definiscono (Recettività, Infettabilità e Vulnerabilità), sono stati utilizzati i dati entomologici del presente studio e sono stati considerati e discussi i dati storici di distribuzione e abbondanza delle specie anofeliche presenti in Maremma, i dati dell'incidenza della malaria, insieme ai dati aggiornati dei casi di malaria importata e dei portatori di gametociti, presenti in letteratura. La formula MacDonald (1957) ha permesso di calcolare i valori teorici della Capacità Vettrice (VC) di *An. labranchiae* (per sito e per mese).

MODELLI STATISTICI E ANALISI DI TIPO GIS

In collaborazione con la Fondazione per il Clima e la Sostenibilità, sono stati elaborati modelli statistici e modelli prototipali di dinamica per la previsione categoriale su base meteorologica del potenziale vettore di malaria, *An. labranchiae* (Fig. 26). Inoltre l'impiego di un sistema informativo computerizzato (Sistema Informativo Territoriale, SIT o Geographic Information System, GIS) ha permesso l'analisi di informazioni derivanti da dati geografici, climatici e biologici per la valutazione del rischio strutturale con produzione di mappe predittive di presenza e densità del vettore nell'area compresa tra la fascia costiera delle province di Grosseto e Viterbo e, verso l'interno, fino a circa 40 Km di distanza dal mare.

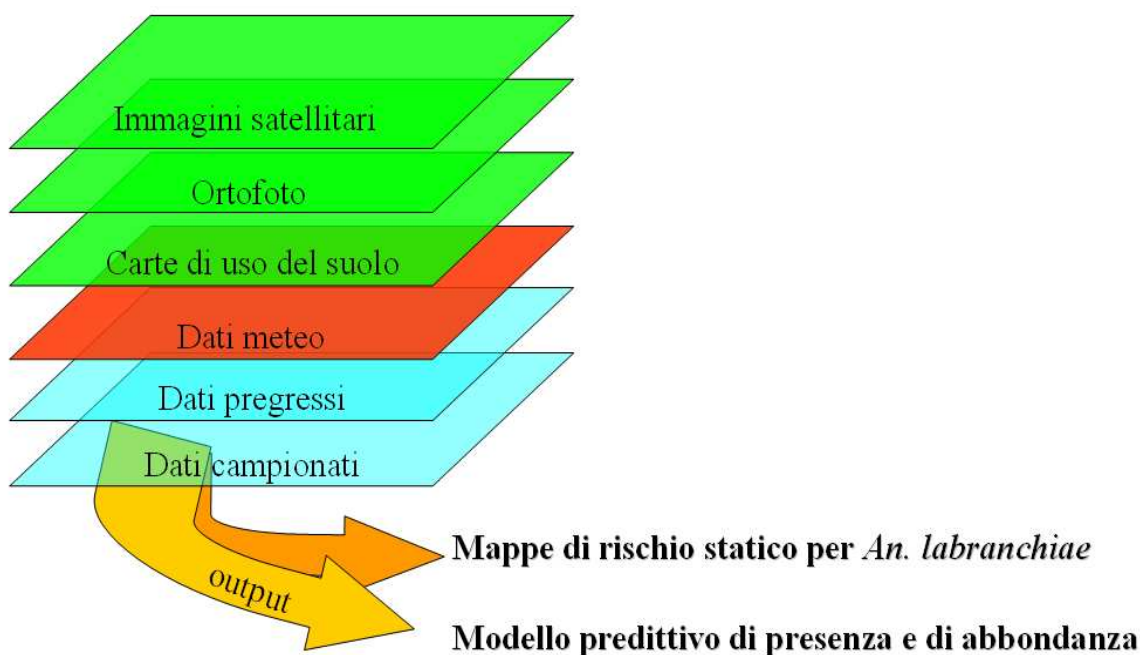


Figura 26. Schema di analisi di tipo GIS, attraverso l'utilizzo di livelli informativi di tipo spaziale e relazionale.

Mappa di rischio statico

Sulla base dei dati di campionamento effettuati nell'area di studio e dei fattori bio-ecologici che favoriscono la presenza di *An. labranchiae*, è stata realizzata una mappa di rischio di presenza/assenza e di abbondanza relativa di questa specie. La potenzialità degli strumenti di tipo GIS per studi ambientali risiede nella possibilità di poter eseguire analisi di tipo spaziale e relazionale tra "strati informativi" diversi tra loro e individuare anche possibili "trend" in senso temporale (Fig. 26). In questo senso è stato necessario acquisire un dettagliato *data set* di informazioni relative alle caratteristiche ambientali dell'area di studio:

- la carta dell'uso del suolo CORINE Land Cover
- l'elenco delle aree umide
- il reticolo idrografico
- l'elenco georeferenziato degli allevamenti zootecnici
- il Modello Digitale del Terreno (DTM).

L'immagine satellitare ASTER è stata acquisita il 30 giugno 2006 ed essa rappresenta le caratteristiche della vegetazione e della copertura del suolo della pianura grossetana (Fig. 27A).

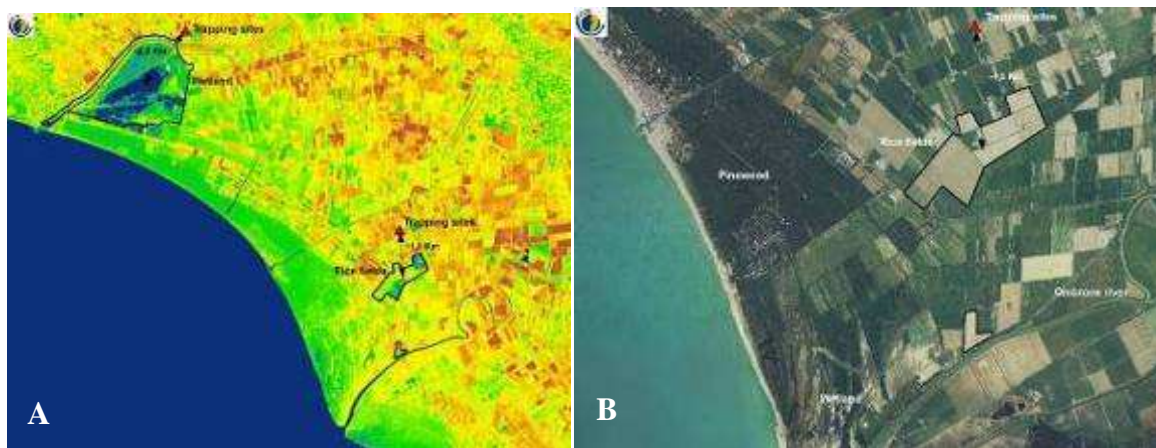


Figura 27. Immagine satellitare ASTER (A) e ortofoto (B) della pianura grossetana.

Immagini a media risoluzione spaziale sono state messe a disposizione dagli archivi della LaMMA-CRES. Sono state impiegate ortofoto riferite al maggio 2007, con risoluzione spaziale di 0.5 m, presenti negli archivi della Provincia di Grosseto (Fig. 27B).

La carta di uso del suolo di dettaglio deriva dalla Carta Tecnica Regionale ed è quindi coerente geometricamente e topologicamente ad essa. Per la pianura alluvionale di Grosseto la carta dei suoli di maggior dettaglio (scala 1:50.000), realizzata dall'Università di Amsterdam (Sevink *et al.* 1987), identifica il modello geo-lito-morfologico della distribuzione spaziale dei suoli (Fig. 28). La classificazione dei suoli applicata è quella della FAO-UNESCO (1974) che offre utili generalizzazioni riguardo alla pedogenesi dei suoli in relazione all'interazione con i principali fattori di formazione del suolo. Le unità di suolo sono state distinte in Associazioni di Suolo in base alla loro unità di suolo dominante con le fasi del suolo (proprietà del suolo, quali salino, litico, roccioso), con tre classi tessiturali (grossolana, media, fine), con tre classi di pendenza (da livellato a gentilmente ondulato, da ondulato a collinoso, e da ripido a montagnoso).

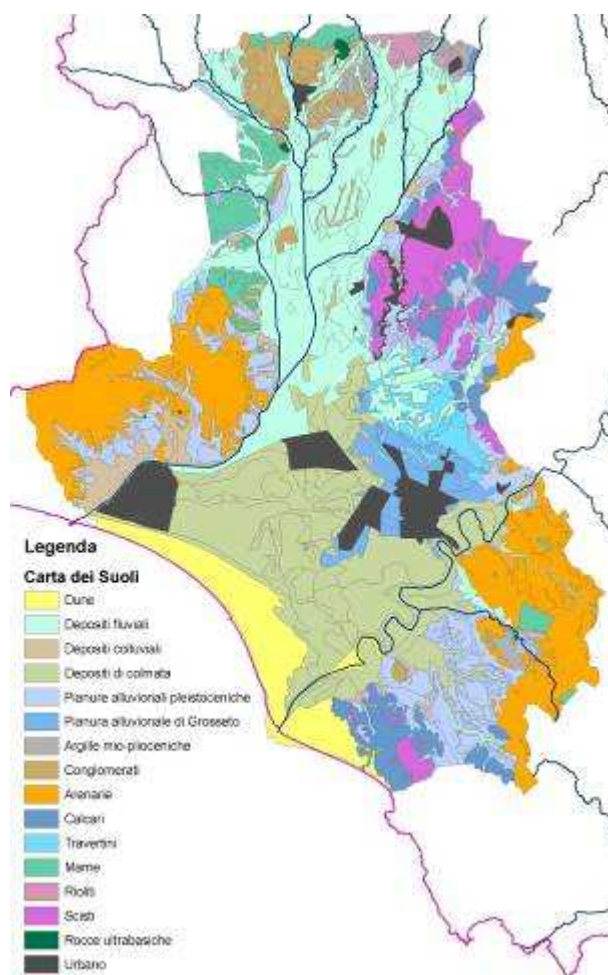


Figura 28. Carta dei suoli della pianura di Grosseto.

Poiché alcuni di questi dati provengono da fonti differenti, si è resa necessaria una loro omogeneizzazione prima dell'elaborazione: i dati di uso del suolo, reticolo idrografico, aree umide e siti zootecnici sono stati convertiti da *shapefile* a formato *raster*; in questa fase sono stati uniformati i parametri relativi al sistema di riferimento spaziale (WGS_1984_UTM_Zone_32N) e altre variabili di ambiente di calcolo (risoluzione della griglia, estensione).

I dati sono stati quindi elaborati con l'applicativo ArcToolbox del software ArcMap ESRI.

A partire dalle informazioni di base dell'uso del suolo e dell'idrografia è stato possibile identificare, anche grazie ai supporti aerofotogrammetrici e satellitari, i potenziali focolai larvali (risaie, laghi, fiumi, stagni, aree umide). In particolare, per i fiumi sono stati considerati solamente i tratti finali degli stessi dove è ipotizzabile un rallentamento della velocità della corrente ed inoltre sono stati esclusi quelli principali (Bruna, Ombrone ed Albegna) nei quali le condizioni di sviluppo delle larve sono ostacolate dal tipo di regime idrico. Per le aree umide, stagni e piccoli invasi sono stati utilizzati le indicazioni ricavabili dalla Carta Tecnica Regionale e dalle immagini satellitari: con opportune operazioni di filtraggio e detection sono stati estrapolati gli invasi sulla base della risposta spettrale dell'acqua. L'habitat delle larve di *An. labranchiae* è stato ulteriormente affinato valutando le soglie di temperatura media delle mappe climatiche elaborate, fissando a 300 m s.l.m. la quota limite oltre la quale è poco probabile individuare la specie.

Rispetto ad ogni potenziale focolaio larvale è stata calcolata la distanza relativa con lo strumento di ArcToolbox. Il dato ottenuto è stato inserito nel modello di calcolo dell'indice larvale insieme alle informazioni relative alle risaie, le aree umide, il reticolo idrografico ed i corpi idrici. Ogni singolo strato informativo è stato moltiplicato per dei coefficienti di regressione derivanti da uno studio analogo condotto sui siti larvali nella regione francese della Camargue (Tran *et al.*, 2008).

Il risultato del modello è un valore definito "indice larvale" che rappresenta la probabilità di avere larve in un sito almeno una volta in un anno. Rispetto a Tran e collaboratori (2008), è stato inserito un ulteriore fattore spaziale che tenesse conto della presenza dei siti zootecnici presenti al di sotto dei 300 m (Fig. 29). Questo dato è stato fornito dal Dipartimento di Zoologia Ambientale dell'ASL 9 di Grosseto e comprende,

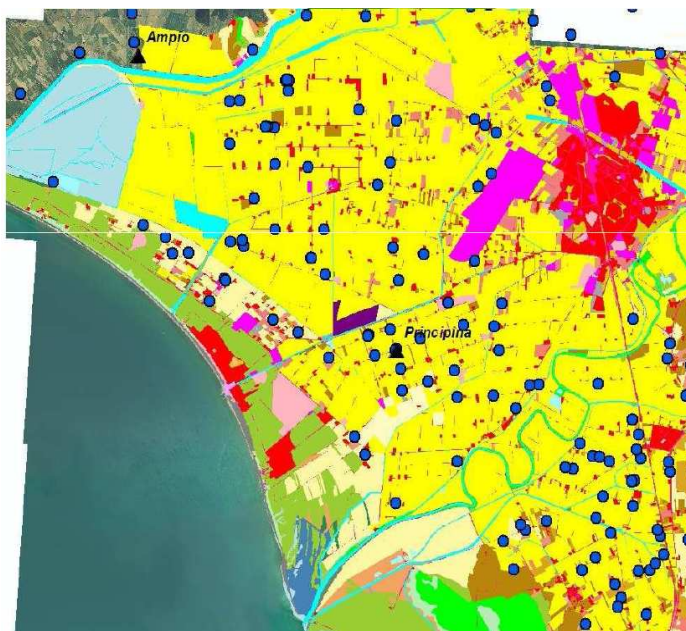


Figura 29. Distribuzione dei siti zootecnici (<300 m s.l.m.) nell'area di studio.

quindi, solo questa provincia.

L'elaborazione è stata svolta con ModelBuilder uno strumento per la progettazione, la simulazione e l'analisi di modelli matematici, integrato nel software ArcMap (Fig. 30).

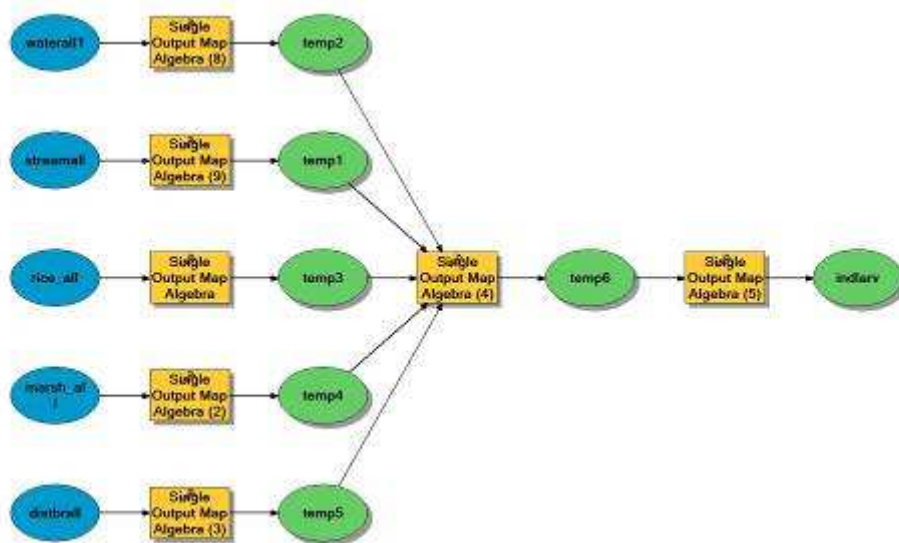


Figura 30. Schema di calcolo dell'indice larvale in ModelBuilder

Modelli statistici categoriali di presenza/assenza e modelli protipali di dinamica

E' stato utilizzato un approccio statistico multiregressivo di tipo logistico per la costruzione di un modello che si basa su dati meteo-climatici e permette di fare previsioni di presenza e abbondanza di *An. labbranchiae* nel territorio della provincia di Grosseto.

Un modello statistico a regressione logistica mette in relazione variabili indipendenti osservate di tipo meteo-climatico con la variabile dipendente da stimare, ovvero la presenza di adulti di *An. labbranchiae*, opportunamente categorizzata.

$$Y = \beta X,$$

$$\text{con } Y = \text{logit}(p) = \ln(p / 1 - p)$$

p: probabilità che si verifichi l'evento Y

β : parametri del modello

Y: presenza/assenza di adulti di *Anopheles labbranchiae*

X: variabili meteo-climatiche

Il modello statistico categoriale di presenza/assenza ha utilizzato, come dati biologici, le catture degli adulti di *An. labbranchiae* nei siti 2 (Valfragida), 9 (Principina), 10 (Ampio) e 11 (Val di Merse), relative agli anni 2005-2008, riportati in maniera lineare, su scala settimanale e categorizzati. I dati relativi al biennio 2005-2006 sono stati impiegati per la calibrazione, mentre quelli del biennio 2007-2008 per la validazione del sistema. I dati entomologici sono stati messi in relazione con i parametri climatici rilevati dalle stazioni meteorologiche più prossime ai punti di campionamento. In Tabella 6 vengono riportati i dati empirici utilizzati sia per la calibrazione che per la verifica dei modelli. Per la categorizzazione è stata ricavata la corrispondente variabile binomiale (0 – assenza, 1 - presenza), e quella multinomiale (0 – assenza, 1 - presenza medio-bassa, 2 presenza medio-alta) attraverso la scelta *a priori* di una soglia di transizione: in particolare si è stabilito che il valore di 60 adulti catturati fosse il limite tra le categorie 1 e 2. Il modello di previsione multinomiale è stato applicato solo per il sito 9, in quanto nel biennio 2005-2006 si sono registrate spesso catture abbondanti ($N > 60$), mentre per gli altri siti è stato sufficiente applicare il modello binomiale di assenza/presenza.

Data-set di calibrazione	Periodo	Sito di raccolta	Stazione meteorologica
	Apr-Ott 2005-2006	2 (Valfragida) 9 (Principina) 10 (Ampio) 11 (Val di Merse)	Tarquini Alberese Casotto dei Pescatori Grosseto Aeroporto
Data-set di validazione	Periodo	Sito di raccolta	Stazione meteorologica
	Apr-Ott 2007-2008	2 (Valfragida)	Tarquini

Tabella 6. Dati empirici utilizzati per la calibrazione/test/validazione dei modelli statistici.

In un caso, per il sito 11, non è stato possibile avere una stazione meteorologica prossima al sito di cattura delle zanzare, per cui i dati meteo potrebbero non risultare del tutto adeguati nel descrivere le peculiarità microclimatiche tipiche di questo luogo.

E' stata quindi condotta un'analisi esplorativa dei dati osservati per individuare quali fossero i fattori meteo-climatici che principalmente influenzassero la presenza della specie sul territorio.

In base alla letteratura e all'esperienza acquisita nel settore biometeorologico da parte delle Fondazione per il Clima e la Sostenibilità, si è preferito usare variabili meteorologiche derivate a scala settimanale come predittori (sommatoria termica a sette e quindici gironi, accumulo di gradi giorno con soglia 5, 10 e 15 °C, escursione termica media, varianza dell'escursione termica, media delle temperature medie, varianza delle temperature medie, numero di giorni con velocità minima del vento inferiore a 2 metri al secondo calcolata tra le ore 8:00 e le ore 20:00, precipitazione cumulata a 7 e 15 giorni, umidità relativa media e deficit di saturazione medio), in luogo dei dati primari (temperatura istantanea, temperatura di rugiada, velocità del vento, umidità relativa e millimetri di pioggia).

Tecnicamente la realizzazione dei modelli statistici è avvenuta attraverso le seguenti operazioni:

- analisi esplorativa dei dati e delle matrici di correlazione tra predittori (variabili termiche e psicometriche) e predittandi (catture degli adulti categorizzate);
- analisi fattoriale sui due raggruppamenti (variabili termiche e psicometriche) al fine di poter ottenere una riduzione della complessità del numero di fattori che spiegano il fenomeno tramite un numero esiguo di fattori incorrelati tra loro;
- modello lineare logistico binomiale e multinomiale, che è essenzialmente un modello a regressione lineare applicabile a variabili di tipo dicotomico (binomiale) o categorizzate (multinomiale);
- procedura iterativa con test di verifica delle informazioni di Akaike per selezionare i parametri

del modello lineare che meglio descrivono i dati osservati;

- restituzione di output grafici e numerici in termini probabilistici (probabilità di ottenere la categoria 0, 1 o 2).

Infine sui modelli ottenuti per ciascun sito sono stati eseguiti appositi test di validazioni (confronti con data set diversi da quello di calibrazione) attraverso l'utilizzo dei seguenti "indici statistici di skill": l'*Hit Rate*, il POD (*Probability Of Detection*) e il FAR (*False Alarm Ratio*) che valutano la performance del modello formulato. Tali indici si basano sulla costruzione di una tabella di contingenza per ogni categoria definita nel modello (una sola tabella per il modello binomiale, 3 tabelle per il modello multinomiale, da ognuna delle quali scaturiscono i relativi indici) (Tab. 7). L'indice Hit Rate indica la probabilità di ottenere previsioni corrette rispetto alla totalità degli eventi ($(a+d) / (a+b+c+d)$), il POD valuta quante sono le previsioni corrette rispetto alla totalità degli eventi osservati ($a/(a+c)$), mentre il FAR determina i falsi allarmi rispetto alla totalità degli eventi previsti ($b/(a+b)$). Per una buona previsione l'Hit Rate e POD devono risultare prossimi ad 1, mentre il FAR prossimo a zero.

	Categoria Osservata 1	Categoria Non Osservata 1
Categoria Prevista 1	A	B
Categoria Non Prevista 1	C	D

a = previsioni corrette; b = falso allarme; c = previsione mancata; d = eventi non previsti

Tabella 7. Esempio di tabella di contingenza; in questo caso la previsione risulta corretta sia se la categoria prevista è 1 così come quella osservata, sia se la categoria prevista non è 1 e neppure lo è quella osservata. Negli altri casi la previsione è mancata oppure viene definita falso allarme.

RISULTATI

PRIMA INDAGINE ENTOMOLOGICA

Nel biennio 2005-2006, durante la stagione favorevole allo sviluppo delle zanzare (aprile-ottobre), è stata condotta una prima indagine entomologica longitudinale nei siti 2, 9, 10 e 11 (Fig. 22). Sono state raccolte 8.274 zanzare, di cui 7.691 (93%) erano anofeline, per il 97,7% (N=8188) appartenenti al complesso *An. maculipennis* (Tab. 8). Nel complesso sono state identificate quattordici specie, appartenenti a cinque generi (Tab. 9). Circa il 15% (N = 1111) dell'intero campione di *An. maculipennis s.l.* è stato identificato mediante morfologia delle uova (Fig. 31) o Multiplex-PCR (Fig. 32); inoltre 25 femmine sono state identificate utilizzando contemporaneamente entrambi i metodi e nessuna discrepanza diagnostica è stata osservata nei risultati. Il 19% (n = 116) del campione, precedentemente identificato con la Multiplex-PCR, è stato sequenziato e ha generato sequenze di *An. labranchiae*, *An. maculipennis ss*, *An. melanoon* e *An. atroparvus*, che condividono il 100% di identità con sequenze omologhe depositate in GenBank. Nessuna variazione intraspecifica è stata rilevata nei campioni esaminati (Di Luca *et al.*, 2009).

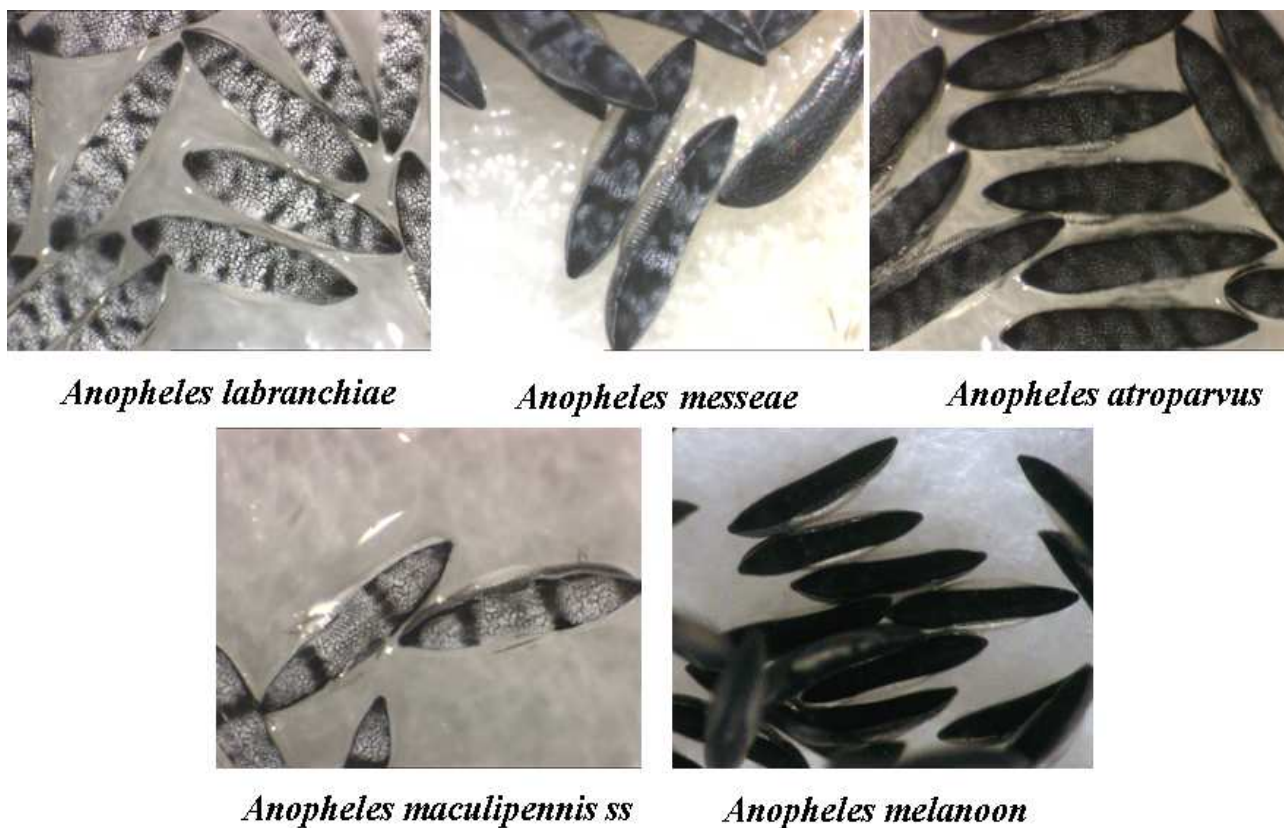


Figura 31. Uova di alcune specie del complesso *An. maculipennis*.

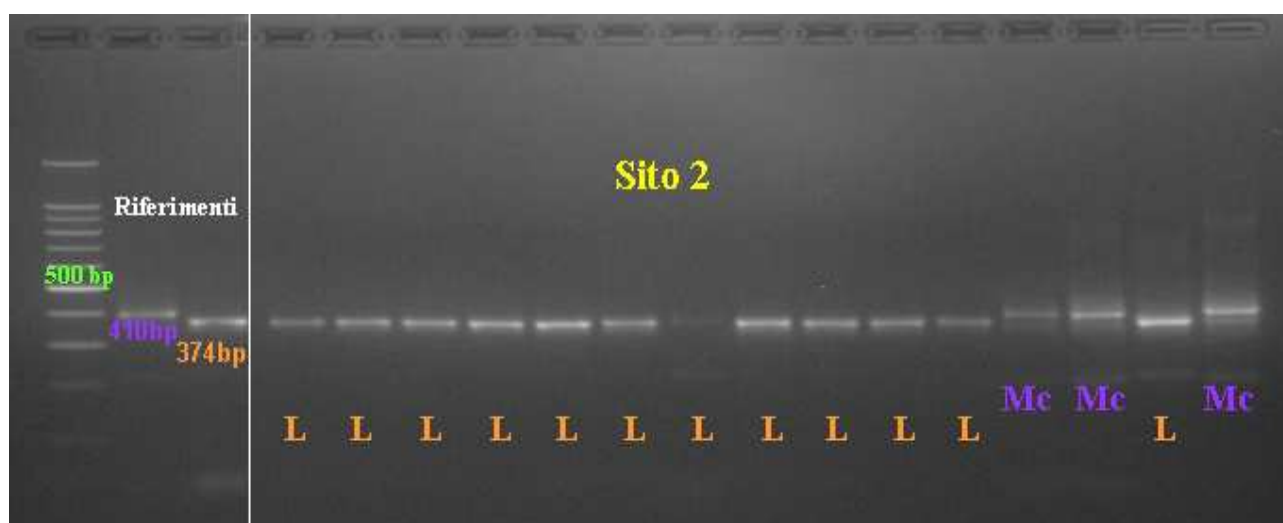


Figura 32. Esempio di diagnosi molecolare utilizzando la Multiplex-PCR (Proft *et al.* 1999) per alcuni esemplari raccolti nel sito 2 (L: *An. labranchiae*; Mc: *An. maculipennis*).

SECONDA INDAGINE ENTOMOLOGICA

Nel biennio 2007-2008 è stata condotta una seconda indagine entomologica con gli stessi tempi e modalità della precedente, nei siti 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8 (Fig. 22). Sono state raccolte 867 zanzare, di cui 714 (82.3%) erano anofeline, per il 96,3% (N=688) appartenenti al complesso *An. maculipennis* (Tab. 8). Nel complesso sono state identificate quindici specie, la maggior parte delle quali comuni a quelle riportate nell'indagine condotta nel 2005-2006, ma con tre ulteriori specie, *Anopheles petragani*, *Aedes vexans* ed *Ochlerotatus geniculatus* (Tab. 9). Il 96% (N = 661) dell'intero campione di *An. maculipennis s.l.* è stato identificato mediante morfologia delle uova (Fig. 31) o Multiplex-PCR; 17 femmine sono state identificate utilizzando contemporaneamente entrambi i metodi e nessuna discrepanza diagnostica è stata osservata.

Sito Località, Comune (Provincia)		Anno	Metodo di cattura			Tot per anno	Tot per sito
			Catture Indoor	Catture su uomo	Trappole CDC		
1	Forca di Parma, Tarquinia (VT)	2007	57	-	4	61	101
		2008	40	-	-	40	
2	Valfragida, Tarquinia (VT)	2005	210	1	0	211	422
		2006	67	-	-	67	
		2007	65	-	3	68	
		2008	76	-	-	76	
3	La Parrina, Montalto di Castro (VT)	2007	18	-	1	19	35
		2008	16	-	-	16	
4	Campo Morto, Montalto di Castro (VT)	2007	138	-	14	152	212
		2008	60	-	-	60	
5	Pantacciano, Tuscania (VT)	2007	14	-	0	14	35
		2008	21	-	-	21	
6	Viterbo	2007	85	-	7	92	126
		2008	34	-	-	34	
7	Civitella Cesi, Monteromano (VT)	2007	4	-	2	6	12
		2008	6	-	-	6	
8	La Turchina, Monteromano (VT)	2007	8	-	3	11	23
		2008	12	-	-	12	
9	Principina (GR)	2005	2826	46	16	2888	4674
		2006	1497	66	223	1786	
10	Ampio (GR)	2005	497	2	0	499	626
		2006	127	-	-	127	
11	Val di Merse (SI)	2005	347	38	0	385	1940
		2006	1450	50	55	1555	
Tot		2005-2008	7675	203	328	8206	

Tabella 8. Numero di esemplari di *Anopheles maculipennis s.l.* raccolti tra il 2005 e il 2008 per sito e per metodo di raccolta.

Specie identificate nel 2005-2006

Anopheles labranchiae Falleroni, 1926
Anopheles maculipennis s.s. Meigen, 1818
Anopheles melanoon Hackett, 1934
Anopheles atroparvus Van Thiel, 1927
Anopheles claviger (Meigen, 1804)
Anopheles plumbeus Stephens, 1828
Ochlerotatus caspius (Pallas, 1771)
Ochlerotatus detritus Haliday, 1833
Aedes albopictus (Skuse, 1897)
Culex pipiens Linné, 1758
Culex impudicus Ficalbi, 1890
Culex hortensis Ficalbi, 1899
Culiseta longiareolata (Maquart, 1838)
Culiseta annulata (Schrank, 1776)

Specie identificate nel 2007-2008

Anopheles labranchiae Falleroni, 1926
Anopheles maculipennis s.s. Meigen, 1818
Anopheles melanoon Hackett, 1934
Anopheles petragrani Del Vecchio, 1939
Anopheles claviger (Meigen, 1804)
Anopheles plumbeus Stephens, 1828
Ochlerotatus caspius (Pallas, 1771)
Ochlerotatus detritus Haliday, 1833
Ochlerotatus geniculatus (Olivier, 1791)
Aedes albopictus (Skuse, 1897)
Aedes vexans (Meigen, 1830)
Culex pipiens Linné, 1758
Culex hortensis Ficalbi, 1899
Culiseta longiareolata (Maquart, 1838)
Culiseta annulata (Schrank, 1776)

Tabella 9. A sinistra elenco delle specie di culicidi identificate durante la prima indagine entomologica (2005-2006); a destra l'elenco delle specie identificate durante la seconda indagine entomologica (2007-2008).

Dinamica di popolazione e composizione di specie del complesso *An. maculipennis*

La dinamica stagionale (DS), la composizione in specie e le frequenze relative (%) delle specie del complesso *An. maculipennis*, per sito e per anno, sono mostrate in Figura 33, per le catture condotte nel biennio 2005-2006 e in Figura 34, per quelle del biennio 2007-2008.

Nel confronto tra siti, sono state rilevate differenze significative nell'abbondanza dei campioni di *An. maculipennis* s.l. per entrambi gli anni di monitoraggio ($p < 0.05$) (Di Luca *et al.*, 2009).

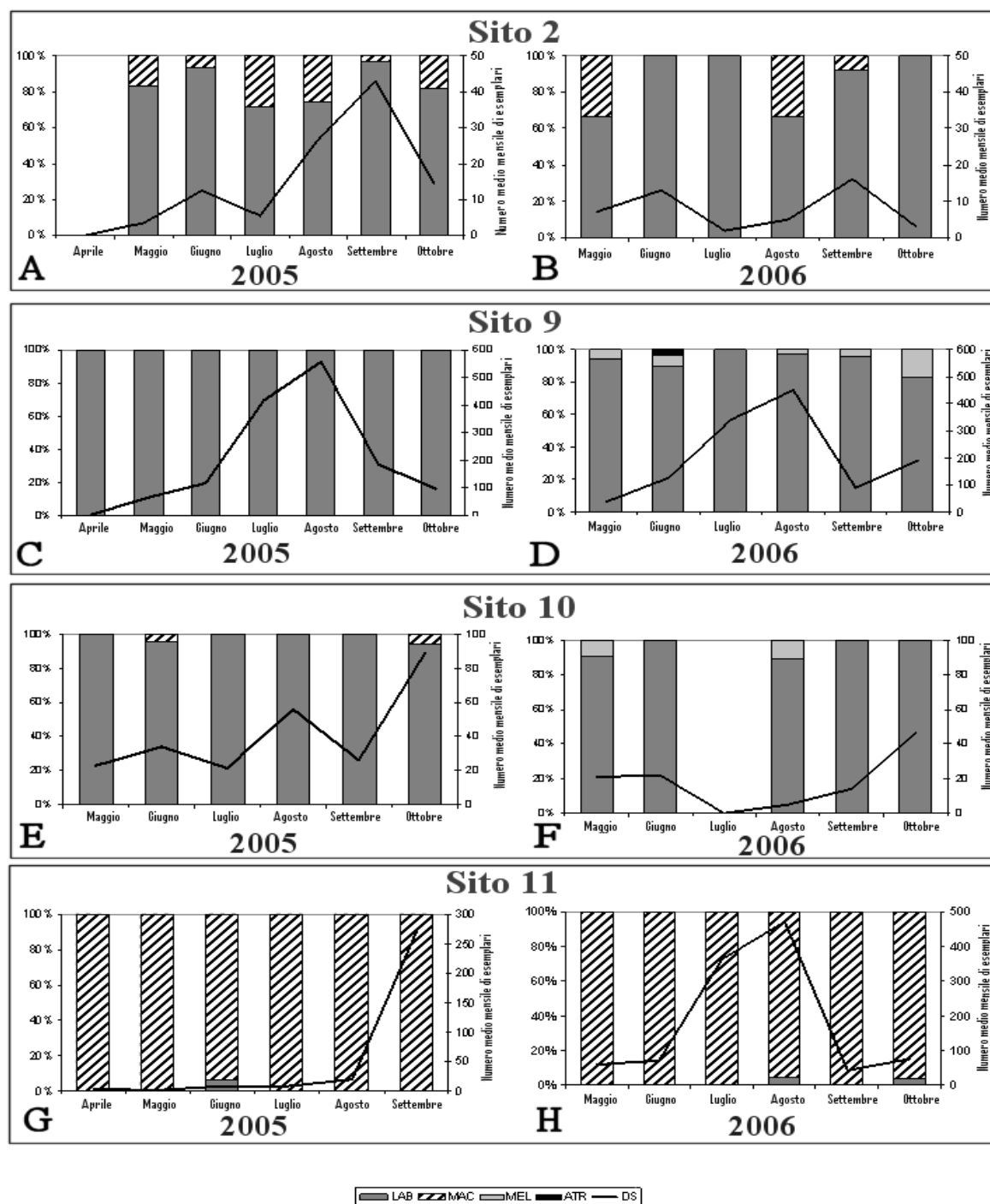


Figura 33. Dinamica stagionale (linea) e composizione in specie (istogramma) per sito e per anno (2005-2006). DS: dinamica stagionale; LAB: *An. labranchiae*; MAC: *An. maculipennis* s.s.; MEL: *An. melanoon*; ATR: *An. atroparvus*.

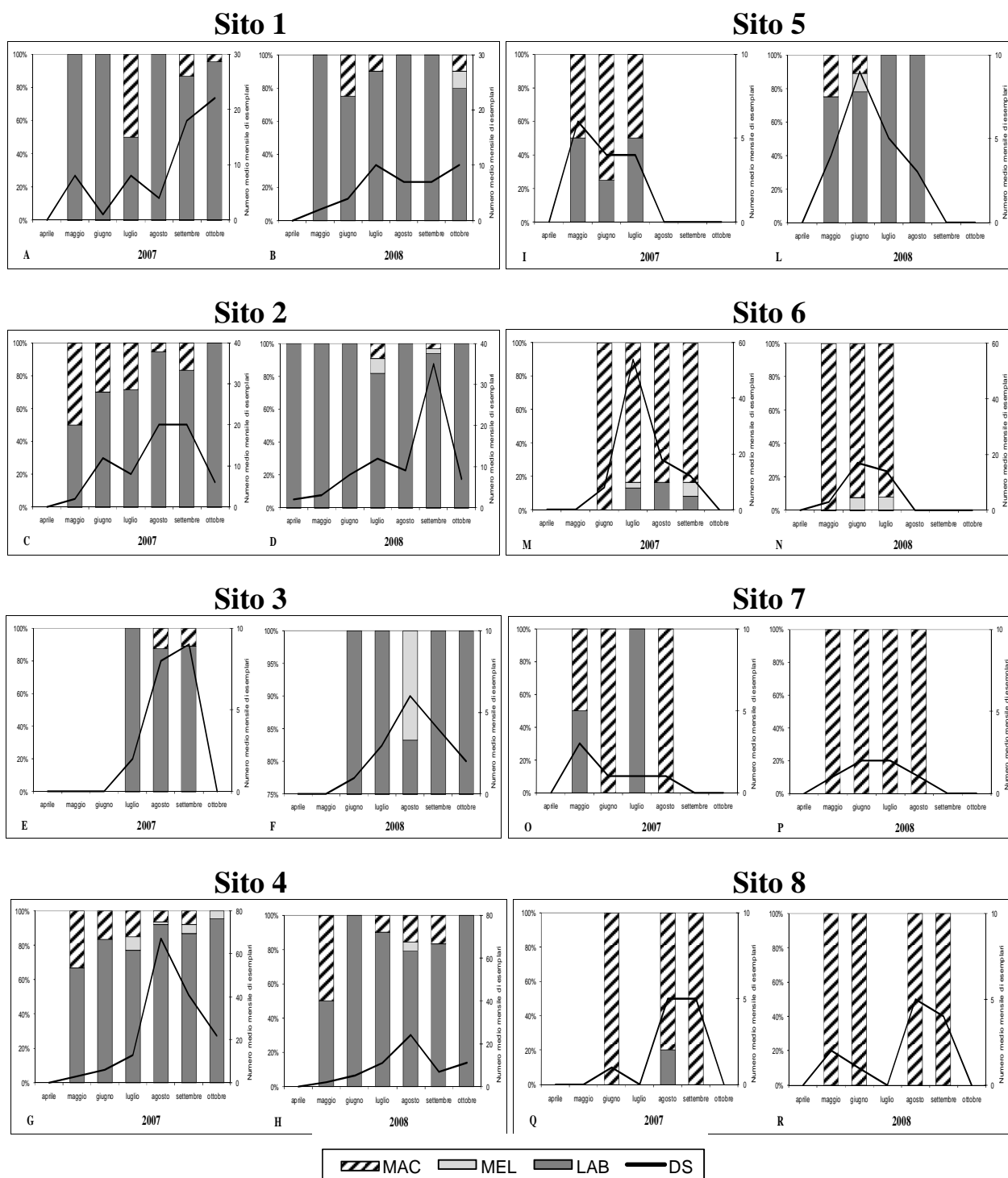


Figura 34. Dinamica stagionale (linea) e composizione in specie (istogramma) per sito e per anno (2007-2008). DS: dinamica stagionale; LAB: *An. labbranchiae*; MAC: *An. maculipennis* ss; MEL: *An. melanoon*.

Sito 1 – il 95% (N=96) degli esemplari raccolti in questo sito nel biennio 2007-2008 è stato identificato sia morfologicamente che molecularmente e nessuna differenza di abbondanza tra i due anni è risultata significativa ($p > 0.05$). La specie prevalente è risultata *An. labranchiae* che è stata trovata in simpatria con *An. maculipennis s.s.* e con *An. melanoon*, quest'ultima specie rinvenuta solo nel 2008. La dinamica stagionale delle specie del complesso ha seguito un andamento differente nei due anni di studio, con un *trend* più irregolare nel 2007, con picchi a maggio, luglio e ottobre, mentre nel 2008 i valori maggiori di densità si sono ottenuti in luglio e in ottobre (Fig. 34 A, B).

Sito 2 - circa il 65% (N = 274) del campione proveniente dalle raccolte stagionali condotte nel quadriennio 2005-2008 è stato identificato. *An. labranchiae* è risultata la specie prevalente, rispetto ad *An. maculipennis s.s.* e *An. melanoon*. In questo sito nessuna differenza di abbondanza tra questi quattro anni è risultata significativa ($p > 0.05$). La dinamica stagionale delle specie del complesso *maculipennis* ha seguito un andamento bimodale. Un primo picco di densità si è avuto a metà del mese di giugno (in media 12 esemplari/mese) per il 2005, 2006 e 2007, mentre nel 2008 l'analogo picco è comparso solo a luglio; un secondo picco più rilevante si è verificato nel mese di settembre (16-43 esemplari/mese) (Fig. 33 A, B e Fig. 34 C, D).

Sito 3 – tutto il campione (N = 35) proveniente dalle raccolte stagionali condotte nel biennio 2007-2008 è stato identificato sia morfologicamente che molecularmente e nessuna differenza di abbondanza tra i due anni è risultata significativa ($p > 0.05$). Le densità delle *Anopheles* raccolte sono risultate relativamente basse in quanto la maggior parte dei ricoveri animali (capannone col tetto di lamiera e stalla in muratura adibita a magazzino) non possedeva le condizioni idonee di temperatura e umidità per le zanzare. La specie prevalente è risultata *An. labranchiae* che è stata trovata in simpatria con *An. maculipennis s.s.* nel 2007 e con *An. melanoon* nel 2008. Gli andamenti stagionali sono abbastanza simili, con un picco tra agosto e settembre nel 2007 e uno ad agosto nel 2008 (Fig. 34 E, F).

Sito 4 – il 91.7% (N=194) degli esemplari raccolti in questo sito nel biennio 2007-2008 è stato identificato e il primo anno è stato caratterizzato da una maggiore densità di zanzare rispetto al secondo ($p < 0.05$), in quanto nel 2008 la porcilaia è rimasta inaccessibile all'indagine entomologica per buona parte della stagione. Anche in questo sito la specie prevalente, *An. labranchiae*, è stata trovata in presenza delle altre due specie del complesso, *An. maculipennis s.s.* e *An. melanoon*. La

dinamica di popolazione ha avuto un andamento analogo nei due anni, con un picco di densità in agosto (Fig. 34 G, H).

Sito 5 – tutti gli esemplari di *An. maculipennis s.l.* (N = 35) provenienti dalle raccolte stagionali condotte nel biennio 2007-2008 sono stati identificati, sia morfologicamente che molecularmente. Nonostante l'esiguità del campione, dovuta probabilmente agli sporadici e non preventivati trattamenti adultici messi in atto dal gestore dell'azienda, nessuna differenza di abbondanza tra i due anni è risultata significativa ($p > 0.05$). Durante il 2007 le catture hanno evidenziato la contemporanea presenza di *An. labranchiae* e *An. maculipennis s.s.* con una leggera prevalenza percentuale di quest'ultima specie, soprattutto nel mese di giugno. L'anno successivo *An. labranchiae* è risultata la specie predominante ($>78\%$) sia rispetto a *An. maculipennis s.s.* che a *An. melanoon* (Fig. 34 I, L).

Sito 6 – il 93.7% (N=118) degli esemplari raccolti in questo sito nel biennio 2007-2008 è stato identificato. In questo sito è stata valutata una differenza significativa nella densità relativa tra i due anni ($p < 0.05$), la cui causa è da ricercarsi nell'interruzione, nel 2008, dell'allevamento dei suini, presenti invece l'anno precedente insieme ai bovini e ad alcuni altri animali da cortile (cani e conigli). La specie predominante in questo sito è stata *An. maculipennis s.s.* che ha condiviso il suo areale con piccole popolazioni di *An. melanoon* e di *An. labranchiae* (solo nel 2007), specie quest'ultima mai rinvenuta in aree così interne del Lazio (Fig. 34 M, N).

Sito 7 – l'83.3% (N=10) degli esemplari raccolti in questo sito nel biennio 2007-2008 è stato identificato sia morfologicamente che molecularmente. Nonostante l'esiguità del campione, l'analisi statistica non ha evidenziato alcuna differenza di abbondanza significativa tra i due anni ($p > 0.05$). L'unica specie rilevata nel 2008 è stato *An. maculipennis s.s.*, mentre l'anno precedente accanto a questa specie era presente *An. labranchiae* (Fig. 34 O, P).

Sito 8 – tutto il campione (N = 23) proveniente dalle raccolte stagionali condotte nel biennio 2007-2008 è stato identificato e nessuna differenza di abbondanza tra i due anni è risultata significativa ($p > 0.05$). Come avvenuto nel sito precedente, *An. maculipennis s.s.* è risultata l'unica specie nel 2008, mentre nel 2007 era stato rinvenuta anche *An. labranchiae* (Fig. 34 Q, R). Anche in questo sito *An. labranchiae* è stato rinvenuta in densità epidemiologicamente irrilevanti, ma la sua presenza non era mai stata rilevata finora.

Sito 9 - circa il 12% (N = 566) del campione di *An. maculipennis s.l.* raccolto nel biennio 2005-2006 è stato identificato e nessuna differenza in abbondanza tra questi due anni è risultata significativa ($p > 0.05$). Nel 2005 *An. labranchiae* è stata l'unica specie registrata, mentre nel 2006 sono state rinvenute altre due specie del complesso, *An. melanoon* e *An. atroparvus* (rispettivamente il 4,9% e lo 0,7% del campione totale). Il *trend* stagionale delle specie del complesso ha mostrato un andamento simile durante il periodo di studio, con una crescita prima graduale nel corso della primavera, quindi più accentuata dal mese di giugno con un picco ad agosto (558 e 449 esemplari, rispettivamente) ed una repentina diminuzione nel mese di settembre (186 e 90 esemplari, rispettivamente). Nel 2005, ad ottobre, la densità delle zanzare ha continuato a diminuire (97 esemplari/mese), mentre nel 2006 si è registrata un'inversione di tendenza (189 zanzare/mese) (Fig. 33 C, D).

Sito 10 - oltre il 34% (n = 214) del campione è stato identificato, permettendo di registrare per il 2005 una maggiore densità di zanzare rispetto al 2006 ($p < 0,05$). Anche qui *An. labranchiae* è risultata la specie più abbondante ($> 96\%$), rinvenuta in simpatia con altre due specie del complesso, *An. maculipennis s.s.* nel 2005 e *An. melanoon*, nel 2006. Un picco di densità nel mese di giugno ha coinciso nei due anni in esame (34 esemplari nel 2005 e 22 nel 2006). Nel 2005 ad un secondo picco apparso ad agosto (56 zanzare/mese) ne è seguito un terzo ad ottobre (89). Nel 2006, invece, al primo picco è seguita una diminuzione drastica nella popolazione, la cui causa è da ricercarsi in un trattamento insetticida operato nei ricoveri per animali da parte dei gestori dell'azienda. Successivamente a questo evento è stato registrato, tra agosto e ottobre, un lento e costante aumento di densità con 46 esemplari catturati a fine stagione (Fig. 33 E, F).

Sito 11 - circa l'11% (n = 214) del campione è stato identificato con differenze significative di abbondanza relativa per il 2005 e 2006, ($p < 0.05$). Qui *An. labranchiae* è stato rinvenuto a densità molto basse (1% nel 2005 e 3% 2006), mentre *An. maculipennis s.s.* è risultata la specie prevalente ($> 97\%$). Nonostante la presenza di impianti risicoli nelle immediate vicinanze della fattoria che assicurano alle zanzare focolai larvali con un apporto costante d'acqua, le dinamiche stagionali hanno evidenziato un *trend* notevolmente diverso nei due anni di monitoraggio, la cui causa più probabile è da ricercarsi nella diversa tipologia di animali allevati (Fig. 31 G, H). Nel 2005 in questo sito erano presenti solo volatili domestici (galline, anatre, oche e tacchini) e la dinamica anofelica è stata caratterizzata da una bassissima densità e da una totale assenza di qualunque picco fino a settembre, mese in cui, in concomitanza dell'inizio di un ciclo di allevamento di suini, si è

registrato un improvviso aumento con oltre 280 esemplari catturati. Nel 2006, essendo stato pianificato un allevamento annuale di suini, è stato registrato un graduale aumento della popolazione di zanzare (circa 70 esemplari a maggio), che ha raggiunto un picco ad agosto (circa 450 esemplari) per poi diminuire drasticamente a settembre (Fig. 33 G, H).

In Figura 35 vengono riportate le fluttuazioni stagionali del complesso di specie *An. maculipennis* durante il biennio 2007-2008. Sono stati aggregati i dati provenienti dai siti distribuiti lungo la fascia pianeggiante maremmana (siti 1-4) e confrontati con quelli dei siti collinari dell'entroterra (siti 5-8). Le differenze di densità risultano statisticamente significative tra i due anni, sia lungo la costa che nell'entroterra ($p < 0.05$). Inoltre i picchi di abbondanza sono concentrati all'inizio dell'estate per le stazioni collinari (a luglio nel 2007 e a giugno nel 2008), mentre sono più tardivi per le stazioni in pianura (ad agosto nel 2007 e a settembre nel 2008).

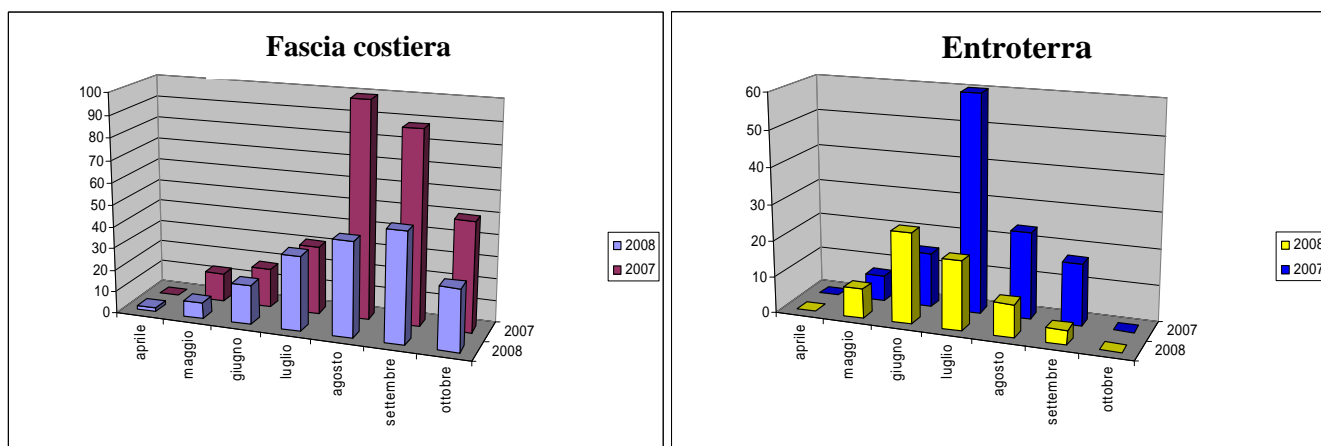


Figura 35. Dinamica stagionale delle specie del complesso *An. maculipennis* raccolte lungo la fascia costiera pianeggiante (a sinistra) e nell'entroterra (a destra) nel biennio 2007-2008.

INDAGINI ENTOMOLOGICHE SPORADICHE

Qui di seguito vengono riportate alcune delle indagini entomologiche che occasionalmente sono state condotte come singoli *surveys* sia nell'area di studio che in altre zone dell'Italia Centrale in anni diversi (Fig. 22).

- ◆ Alviano (A) e Fabro (B): nel settembre 2003 all'interno di porcilaie, conigliere e pollai sono state catturate 15 *An. maculipennis s.l.*, che identificate sono risultate 9 *An. maculipennis s.s.*, 2 *An. atroparvus*, 2 *An. labbranchiae*, 2 *An. melanoon* (Boccolini *et al.*, 2004).
- ◆ Cinigiano e Casenovole (C): nel luglio 2006 nelle due località sono stati raccolti 18 esemplari di *An. maculipennis s.l.* in conigliere e porcilaie. Dall'indagine morfologica e molecolare è risultato che 8 erano *An. maculipennis s.s.*, 7 *An. atroparvus*, 3 *An. labbranchiae*.
- ◆ San Donato (D): nel luglio 2007 sono state raccolte in quest'area, storicamente malarica, 208 *An. maculipennis s.l.* in stalle per cavalli. Sia la diagnosi morfologica delle uova che l'analisi molecolare hanno confermato *An. labbranchiae* come unica specie. Nelle risaie le larve di anofelini presentavano una densità pari a 0.1-0.2 larve /pescata.
- ◆ Parco dell'Uccellina, (E): nel luglio 2007 sono state raccolte 80 anofeline in stalle per cavalli e in ricoveri aperti per le mucche maremmane e tutte sono state identificate come *An. labbranchiae*. Nei focolai larvali, rappresentati da canali irrigui e da canali di bonifica, sono state raccolte larve di anofelini lungo i bordi a basse densità (<0.01 larve/pescata).
- ◆ Borgheria (TR): nel settembre 2008 sono state catturate 68 femmine e 2 maschi di *An. maculipennis s.l.* in stalle per cavalli e per mucche. L'analisi morfologica e molecolare è stata condotta sull'87% del campione e ha permesso di identificare 52 *An. maculipennis s.s.*, 3 *An. labbranchiae* e 6 *An. melanoon*. In una vicina vasca per la raccolta delle acque non sono state rinvenute larve di anofelini.
- ◆ Principina (Sito 9): nel luglio 2007 delle 15 *An. maculipennis s.l.* poste a deporre per l'analisi morfologica delle uova, 7 hanno dato uova di *An. labbranchiae*, mentre le altre non hanno deposto.
- ◆ Principina (Sito 9): nel settembre 2008, dei 27 esemplari catturati, 21 erano *An. labbranchiae*, 2 *An. melanoon*, mentre gli altri non sono stati identificati.
- ◆ Principina (Sito 9): nel settembre 2009, dei 55 esemplari catturati, 44 sono risultati *An. labbranchiae*, 1 *An. melanoon*, 1 *An. maculipennis s.s.*, mentre gli altri non sono stati identificati.

In Figura 36 viene riportata la distribuzione e la composizione percentuale delle specie del complesso *maculipennis*, campionate sia durante le raccolte entomologiche occasionali, sia durante le due indagini longitudinali. Nell'area di studio *An. labranchiae* risulta distribuito, in maniera preponderante, lungo tutta la fascia costiera delle pianure maremmane, sia della Toscana che del Lazio. La sua presenza si spinge nell'entroterra, con percentuali che vanno diminuendo man mano che si procede verso l'interno, nelle province di Siena, Viterbo e Terni, e viene rinvenuto in simpatria con altre specie del complesso: *An. atroparvus*, distribuito in aree più settentrionali ed orientali, *An. maculipennis s.s.*, presente un po' ovunque, e *An. melanoon* rinvenuto sporadicamente sul territorio.

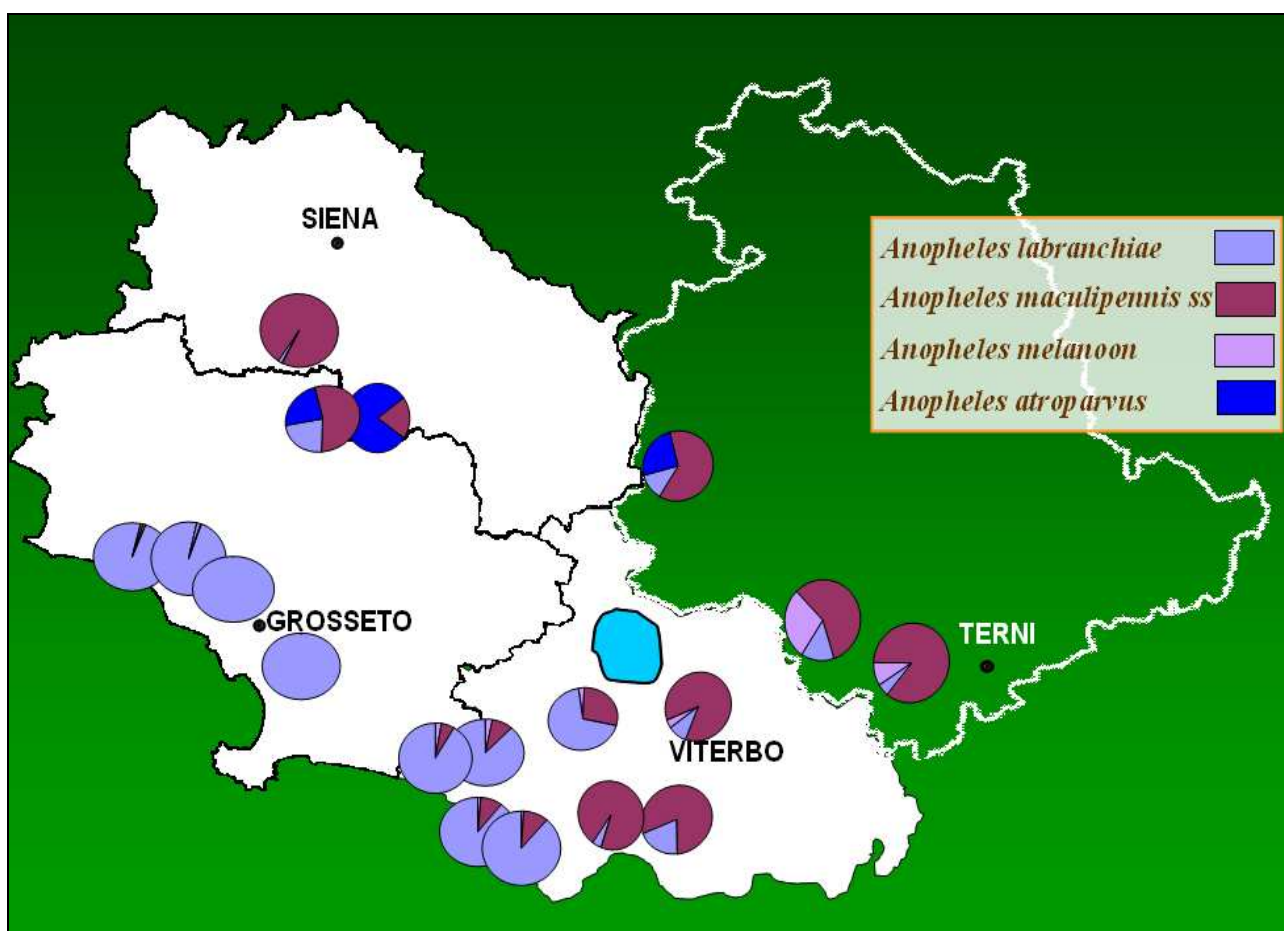


Figura 36. Distribuzione percentuale (torte) delle specie del complesso *An. maculipennis* nelle province di Siena, Grosseto, Viterbo e Terni.

TASSO DI PARITÀ

Dall'analisi molecolare compiuta sugli esemplari utilizzati per questi esperimenti risulta che *An. labranchiae* è l'unica specie identificata per i siti 2, 9 e 10 e *An. maculipennis* s.s. per i campioni provenienti dal sito 11.

Il tasso di parità in una popolazione è dato dalla frazione delle femmine che hanno già deposto almeno una volta (pare), su quelle vergini (nullipare) ed è un indice dell'età della popolazione (Detinova, 1962), per cui in primavera è previsto un basso valore di parità che aumenta col procedere della stagione.

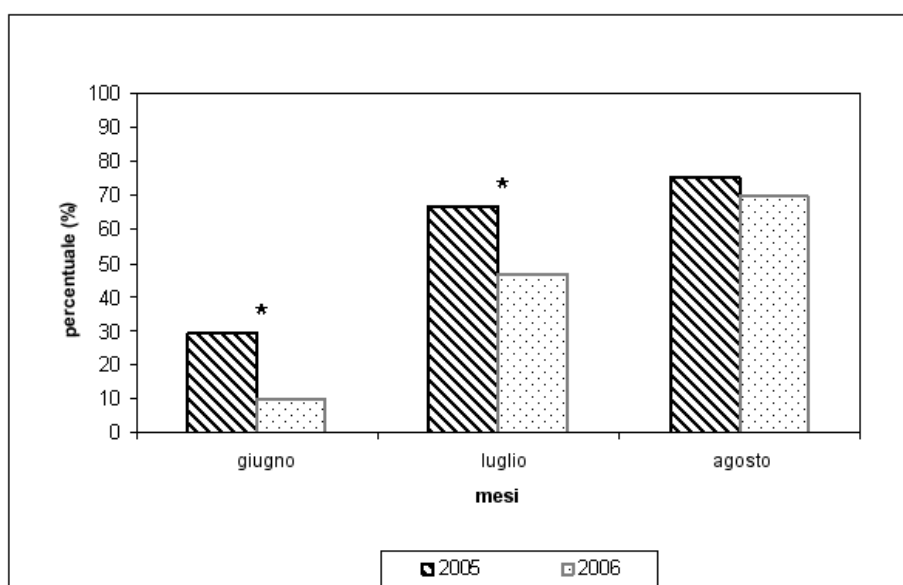


Figura 37. Tasso di parità nel periodo giugno-agosto 2005 e 2006 per le popolazioni di *An. labranchiae* presenti nel sito 9 (Principina).

* valori statisticamente significativi ($p < 0.05$).

Da giugno ad agosto 2005 e 2006, è stato valutato il tasso di parità per il sito 9 (Fig. 37), che mostra un andamento analogo durante i due anni.

Nei mesi di giugno e luglio sono stati riscontrati valori sensibilmente differenti nei due anni: 30% nel giugno 2005 rispetto al 10% del giugno 2006, e 65% per luglio 2005

rispetto al 46% per il luglio 2006 ($p < 0.05$); ad agosto invece i valori dell'età delle popolazioni raggiungono valori simili (70-75%) in entrambi gli anni ($p > 0.05$) (Di Luca *et al.*, 2009).

ATTIVITÀ TROFICA E PREFERENZE ALIMENTARI

I risultati delle catture notturne effettuate su uomo negli anni 2005 e 2006 sono descritti in Figura 38. Nel sito 9, la maggior parte di *An. labranchiae* è stata raccolta durante la prima ora di esposizione (dalle ore 20:00 alle ore 21:00), anche se l'attività trofica di questa specie è rimasta relativamente elevata anche nelle ore successive, fino alle 24:00 h; inoltre è stata osservata una significatività statistica tra i due anni ($p < 0.05$). Nel sito 11, invece, non sono state riscontrate differenze significative ($p > 0.05$) e l'attività trofica di *An. maculipennis* s.s. è apparsa piuttosto elevata durante le prime due ore, diminuendo drasticamente dopo le ore 22:00 e concludendosi definitivamente alle ore 23:00 (Di Luca *et al.*, 2009).

Da un campione di 258 femmine replete di *An. maculipennis s.l.*, raccolto nel 2005-2006, nei siti 2, 9, 10 e 11, è stato analizzato il contenuto dello stomaco con il metodo ELISA su nitrocellulosa (Fig. 39) per stabilire l'origine del pasto di sangue e valutare quindi le preferenze alimentari delle zanzare (Boccolini *et al.*, 2008). Il pasto è stato effettuato su sei ospiti vertebrati e nessun esemplare ha mostrato un duplice pasto. In *An. labbranchiae* (N = 237) è stato possibile evidenziare una preferenza alimentare per i grandi mammiferi (nell'ordine: bovini, ovini, suini, cavalli) e quindi per il pollame. Solo 3 esemplari, raccolti in un garage nel sito 9, sono risultati positivi al siero anti-uomo. L'attività trofica di *An. maculipennis s.s.* (N = 21) ha riguardato esclusivamente suini e pollame (Tab. 10).

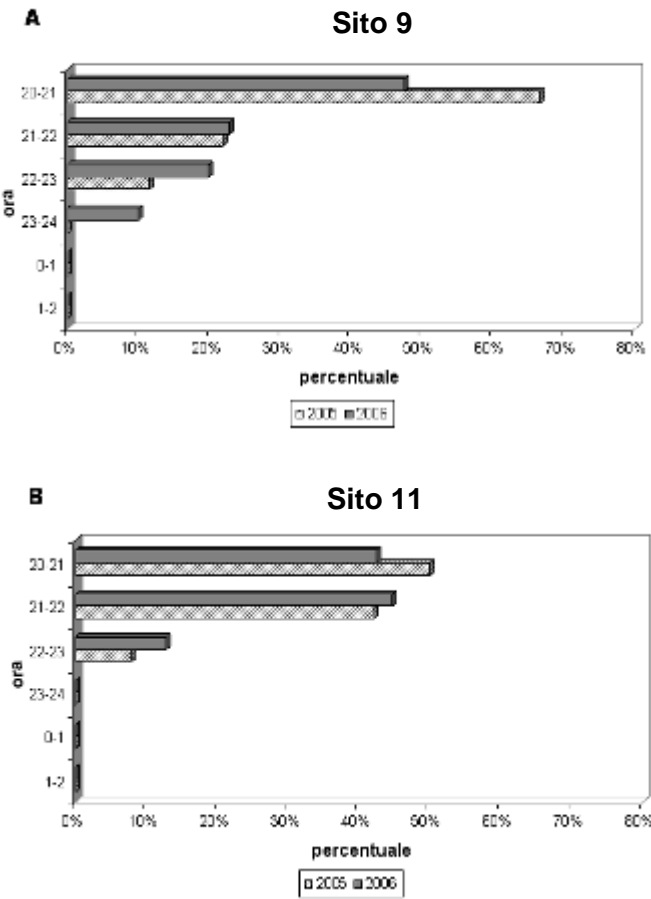


Figura 38. Catture notturne su uomo condotte durante l'estate (luglio-settembre) 2005-2006 nei siti 9 e 11. Le catture sono riportate come percentuali totali di esemplari catturati per diverse fasce orarie (dalle 20 alle 2).

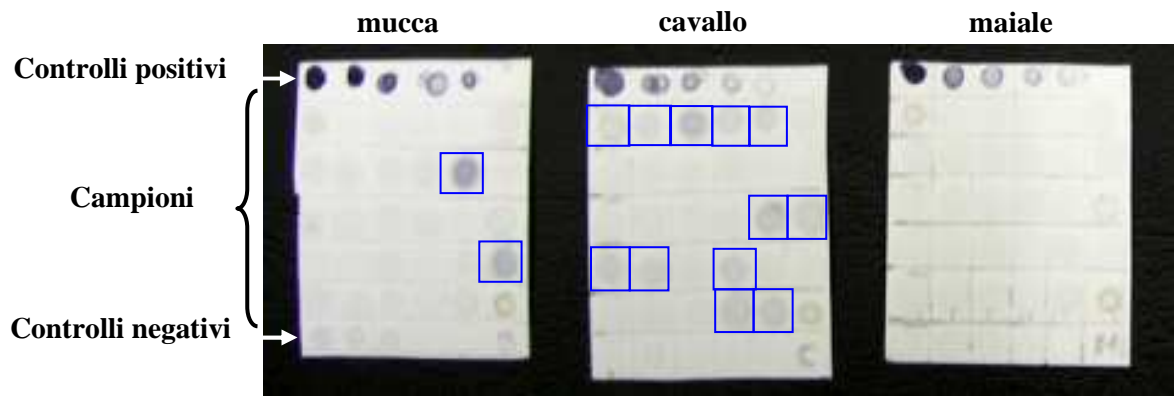


Figura 39. Analisi col metodo ELISA per identificare l'origine dei pasti di sangue. Il campione è stato considerato positivo quando lo spot di sangue su nitrocellulosa assumeva la colorazione blu (riquadri) (Boccolini *et al.*, 2008).

sito	specie	mucca	pecora	maiale	cavallo	coniglio	cane	uomo	pollo	Tot
2	LAB	36								36
9	LAB	45	75	39	15			3	9	186
10	LAB				15					15
11	MAC			16					5	21
Tot (%)		81 (31.4)	75 (29.1)	55 (21.3)	30 (11.6)	0 (0)	0 (0)	3 (1.2)	14 (5.4)	258

Tabella 10. Identificazione (per sito e per ospite) dei pasti di sangue di femmine di *An. labranchiae* (LAB) e *An. maculipennis* s.s. (MAC) catturate nel 2005-2006, usando il saggio ELISA.

Un'indagine analoga è stata condotta per campioni di zanzare raccolte nelle indagini entomologiche del biennio 2007-2008. In questo caso però è stata impiegata una nuova Multiplex-PCR messa a punto per questo scopo (Fig. 40). Anche in questi campioni, a seconda della tipologia di animali domestici presenti in ciascun sito, *An. labranchiae* ha mostrato una preferenza alimentare nei confronti dei grandi mammiferi (suini, ovini, bovini, caprini). Solo un esemplare catturato nel sito 1 si è nutrito sull'uomo (Tab. 11).

Nel confronto tra i volatili da cortile, risulta che *An. labranchiae* si nutre più spesso sui polli rispetto alle altre specie di uccelli domestici, perché numericamente più abbondanti nei siti analizzati (dati non mostrati).

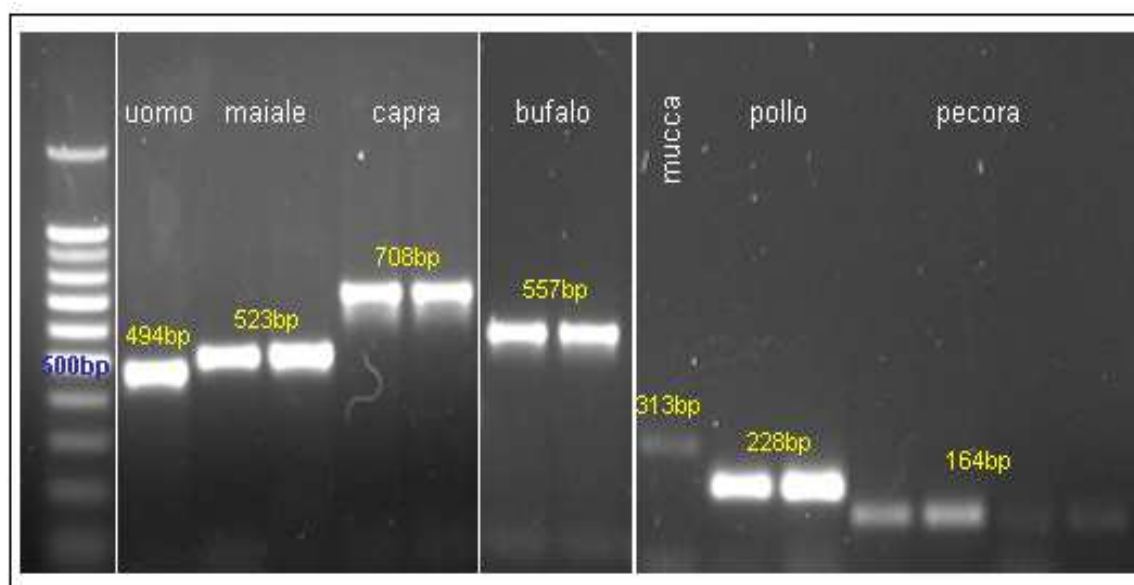


Figura 40. Analisi per identificare l'origine dei pasti di sangue utilizzando la Multiplex-PCR. I prodotti di PCR che si ottengono hanno una dimensione, e quindi un'altezza diagnostica.

sito	specie	mucca	bufalo	pecora	capra	maiale	cavallo	asino	coniglio	cane	gatto	uomo	ratto	pollo	Tot
1	LAB		2	7								1			10
2	LAB	2													2
3	LAB				3										3
4	LAB					9								2	11
5	LAB			5											5
6	LAB	3				8									11
7	LAB			2											2
8	LAB			1											1
Tot (%)		5 (11.1)	2 (4.4)	15 (33.3)	3 (6.7)	17 (37.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.2)	0 (0)	2 (4.4)	45

Tabella 11. Identificazione (per sito e per ospite) dei pasti di sangue di femmine di *An. labranchiae* (LAB) catturate nel 2007-2008, usando la Multiplex-PCR, messa a punto in questo studio.

CALCOLO DELLA CAPACITÀ VETTRICE

La capacità vettrice di *An. labranchiae* è stata valutata sia per *P. falciparum* che per *P. vivax*, in quattro siti dell'area di studio, per gli anni 2005-2006, usando la formula di MacDonald (1957). A questo scopo, in base alla letteratura corrente, sono stati stabiliti *a priori* i seguenti parametri:

- ◆ all'antropofilia della specie (HBI) è stato assegnato un valore pari a 0.5;
- ◆ il ciclo gonotrofico della zanzara è stato considerato mediamente di tre giorni;
- ◆ il ciclo sporogonico è stato considerato di 11 giorni per *P. falciparum* e 10 giorni per *P. vivax*, ad una temperatura media giornaliera di 25°C.

I valori per i mesi di giugno, luglio ed agosto sono riportati in Tabella 12.

sito	2 Valfragida		9 Principina		10 Ampio		11 Val di Merse	
	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>	<i>P.falciparum</i>	<i>P.vivax</i>
giugno	NC	NC	<0.01	<0.01	NC	NC	NC	NC
luglio	<0.1	<0.1	<5-10>	<5-10>	<0.1-0.5>	<0.1-0.5>	<0.01	<0.01
agosto	<1	<1	<2-4>	<3-5>	<0.8-2>	<0.9-3>	<0.1	<0.1

Tabella 12. Valori della capacità vettrice (VC) di *An. labranchiae*, sia per *P. falciparum* che per *P. vivax*, per il biennio 2005-2006, in quattro siti dell'area di studio.

ANALISI ULTRASTRUTTURALE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE

Al SEM è stato analizzato l'apparato riproduttore femminile di tre anofelini, *An. labranchaie*, *An. maculipennis s.s.* e *An. stephensi*. In queste specie esso presenta una struttura analoga costituita da due ovari e due ovidotti laterali, una singola spermateca ed una singola ghiandola accessoria (Fig. 41 e Fig. 42).

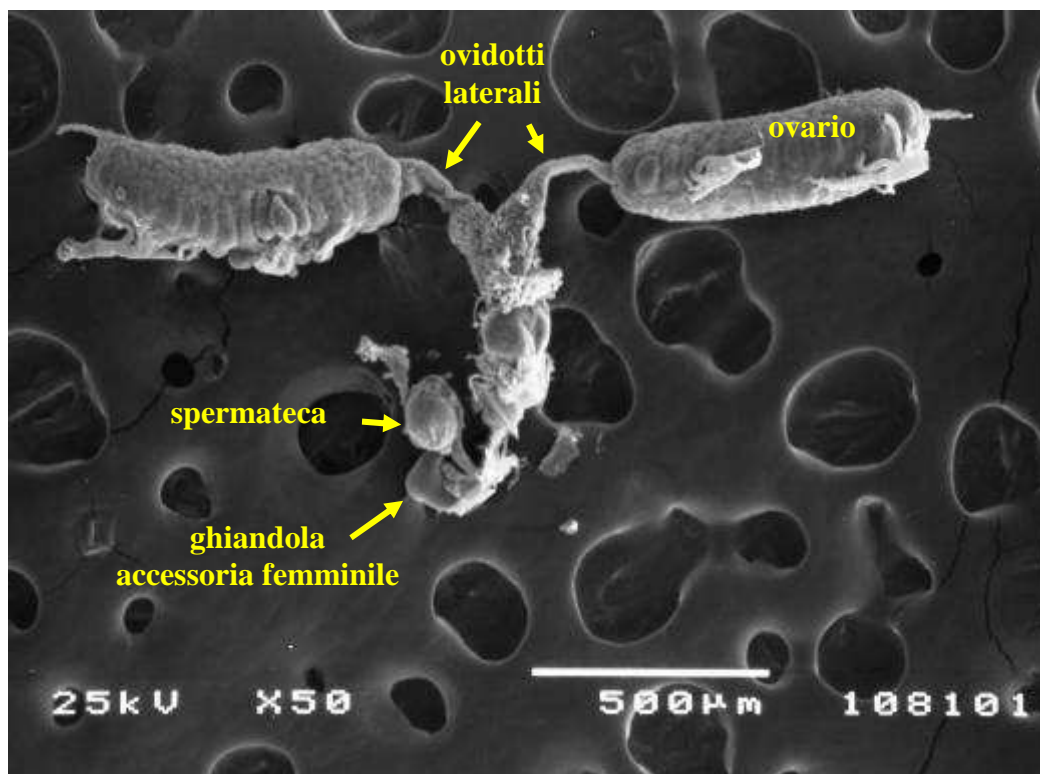


Figura 41. Apparato riproduttore femminile al SEM.

Come osservato all'ottico e al TEM, la spermateca ha una forma sferica ed una struttura cuticolare pigmentata; è circondata da un sottile strato di cellule epiteliali e, al polo posteriore, presenta una placca di cellule ghiandolari più grandi. Lo strato cuticolare contiene numerose piccole aree depigmentate che conferiscono alla struttura un apparente aspetto perforato e che al TEM appaiono come zone in cui la cuticola è più

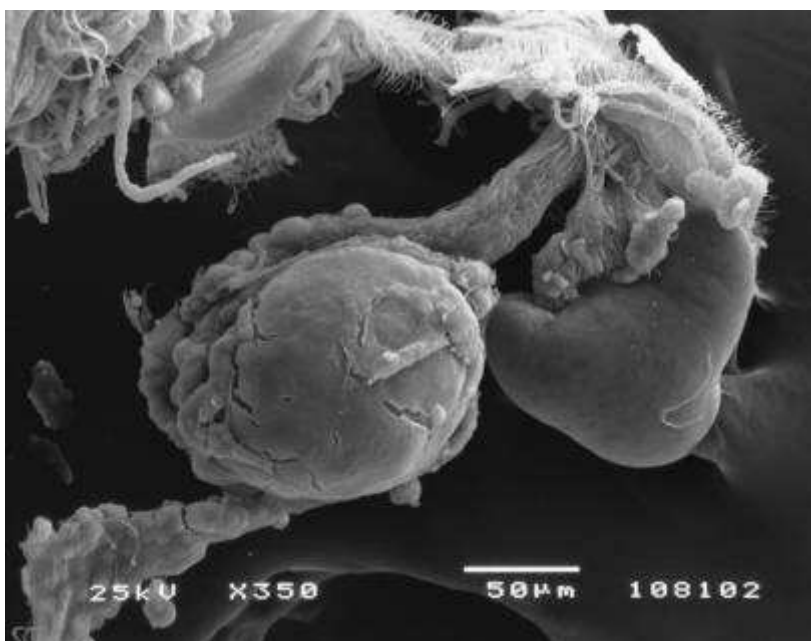


Figura 42. Particolare della spermateca (a sinistra) e della ghiandola accessoria femminile (a destra) di *An. maculipennis s.s.* al SEM.

sottile (Fig. 43).

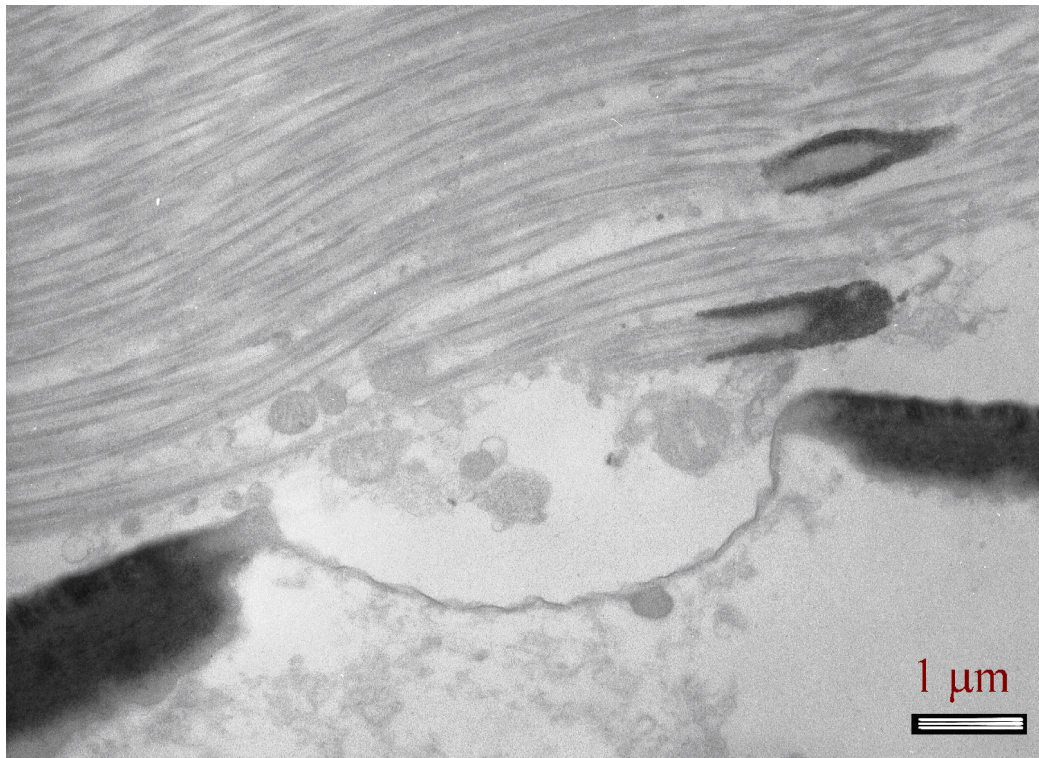


Figura 43. Particolare della parete della spermateca: l'area più sottile, al centro, appare all'ottico come depigmentata.

La ghiandola accessoria è globulare e, attraverso un sottile dotto, è connessa alla vagina in prossimità dell'apertura del dotto spermatecale. Mentre le dimensioni della ghiandola variano nelle tre specie in esame, come mostrato in Figura 44 (*An. stephensi* possiede la ghiandola più piccola, *An. maculipennis* s.s. la più grande, *An. labranchiae* quella di dimensione intermedia), la struttura rimane analoga.



Figura 44. Spermateca e ghiandola accessoria in femmine gravid di *An. maculipennis* s.s. (a sinistra), *An. labranchiae* (al centro) e *An. stephensi* (a destra).

La ghiandola è, infatti, costituita da cellule allungate, cilindriche presenti intorno ad un canale centrale che termina con due sottili diramazioni. Osservata all'ottico, la parete del canale ha un

aspetto rugoso per la presenza di duttuli che emergono dalla porzione apicale delle cellule allungate. Distalmente, il canale prosegue nel dotto della ghiandola, che si apre nella vagina.

In *An. labranchiae* è stato investigato l'effetto dell'assunzione del pasto di sangue sulle dimensioni della ghiandola, durante tutto il ciclo gonotrofico. L'analisi ai diversi stadi ha mostrato una crescita significativa della ghiandola subito dopo il pasto, tanto da raddoppiare le dimensioni, ma non durante la digestione, fase in cui l'organo non muta di dimensioni (Fig. 45). Dopo la deposizione la ghiandola si riduce, ma rimane comunque più grande di quella presente nelle femmine nullipare.



Figura 45. Variazione nelle dimensioni della ghiandola accessoria femminile di *An. labranchiae* durante il ciclo gonotrofico. (A sinistra, prima del pasto di sangue; al centro, subito dopo il pasto; a destra, dopo parziale digestione).

Come in molte ghiandole ectodermiche di insetti anche la ghiandola accessoria è composta da due distinte porzioni: al microscopio ottico si riconoscono cellule ad attività secretoria e cellule che costituiscono il dotto, secondo l'organizzazione il tipo III di Noirot e Quennedey (1974) (Fig. 46).

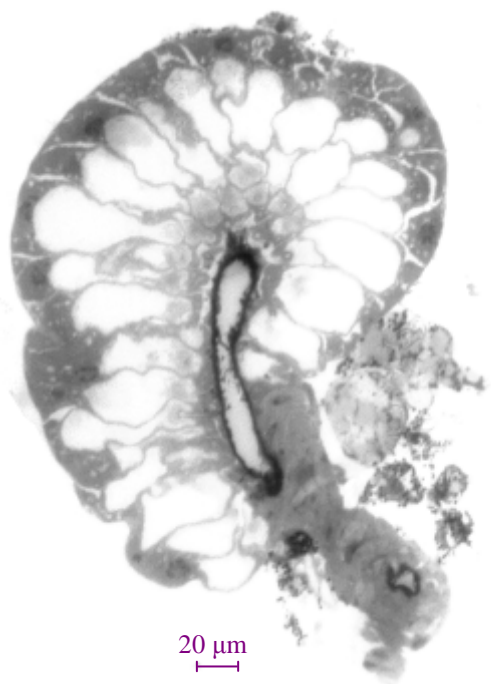


Figura 46. Ghiandola accessoria di *An. labranchiae* subito dopo il pasto di sangue, all'ottico.

In sezioni trasversali condotte attraverso la porzione secretoria della ghiandola ed esaminate al TEM, si osservano, procedendo dall'interno all'esterno, i seguenti elementi: un'intima cuticolare di spessore variabile che riveste il lume, quindi uno strato di piccole cellule (le cellule secernenti il dotto), uno strato di grandi cellule piriformi secernenti ed infine una membrana basale (Fig. 47).

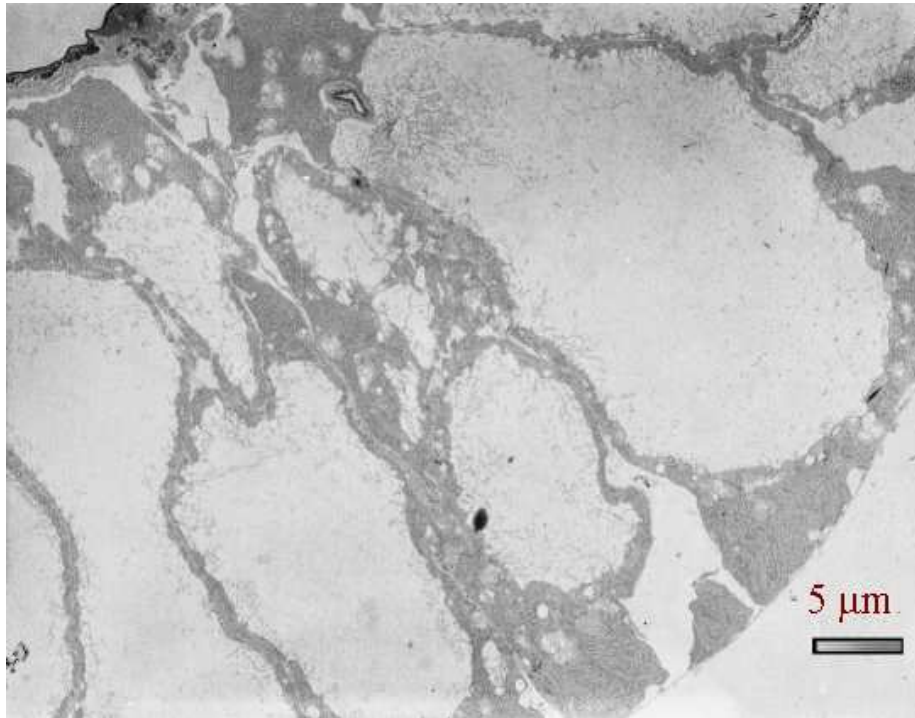
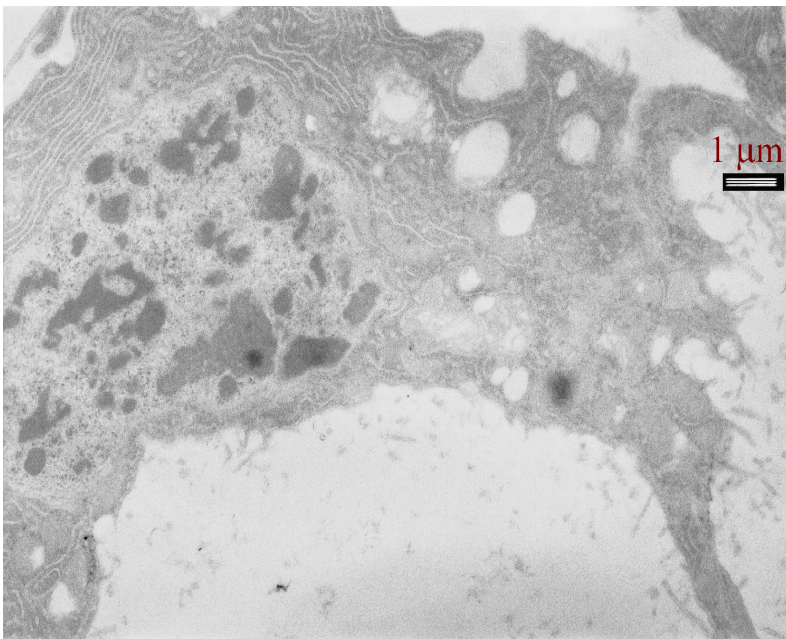


Figura 47. Porzione della ghiandola accessoria di *An. labranchiae* al TEM.

Quarantotto ore dopo il pasto di sangue, le cellule ad attività secretoria presentano la maggior parte del citoplasma e il grande nucleo localizzati alla parte basale della cellula, mentre la porzione apicale è costituita da due lunghe propaggini citoplasmatiche che circondano il serbatoio in cui si riversa il secreto (Fig. 48). Al TEM il secreto ha un aspetto filamentoso ed appare circondato da delicati setti costituiti da cellule adiacenti e dalle quali protrudono corti microvilli. I nuclei hanno



forma irregolare, presentano ampi nucleoli e grandi masse di cromatina condensata. Il citoplasma è ricco di lunghe ed irregolari cisterne del reticolo endoplasmatico ruvido, spesso disposte tra loro parallelamente, di mitocondri e di apparati del Golgi associati a numerose vescicole. Molti di questi elementi sono localizzati presso una cavità extracellulare (Fig. 48).

Figura 48. Particolare della parte basale di una cellula secretoria: è possibile evidenziare il grande nucleo ovoidale ed il citoplasma ricco di reticolo endoplasmatico ruvido e numerose vescicole con materiale elettrone trasparente. Numerosi microvilli protrudono nella cavità ricca di materiale secretorio debolmente fibroso.

Il materiale secreto si addensa intorno alla parte apicale complessa di un breve dotto efferente o duttulo. Quest'ultimo collega la cavità delle cellule secretorie al lume della ghiandola e risulta in continuazione con l'intima cuticolare che lo riveste. Sia l'intima cuticolare, sia la cuticola del dotto efferente sono formate dalle cellule del dotto. Quindi il materiale di secrezione passa attraverso il complesso apice del duttulo, che mostra piccoli fori, ed è drenato dal serbatoio cellulare nel lume della ghiandola accessoria (Fig. 49).

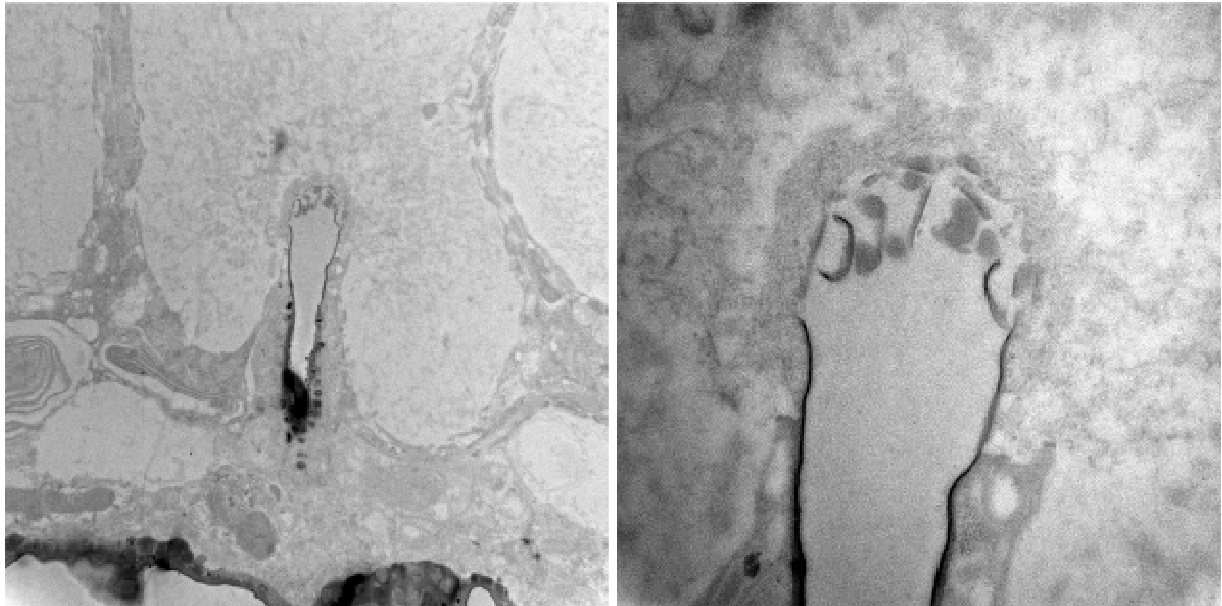


Figura 49. A sinistra l'apparato terminale che connette la cavità della cellula secretoria al lume della ghiandola di *An. labranchiae* (x16000). A destra particolare della parte apicale complessa del duttulo (x50000).

Le cellule del dotto sono piatte: presentano un nucleo allungato, mitocondri e reticolo endoplasmatico ruvido. Sono unite fra loro da giunzioni settate e prendono contatto attraverso estroflessioni citoplasmatiche con le cellule secretorie. Le cellule del dotto elaborano il materiale elettrondenso cuticolare che va a formare la sottile parete del duttulo e la spessa e complessa parete del dotto cuticolare (Fig. 50 e Fig. 51).

Non sono state identificate fibre muscolari intorno al corpo ghiandolare, che sono invece presenti intorno al dotto.

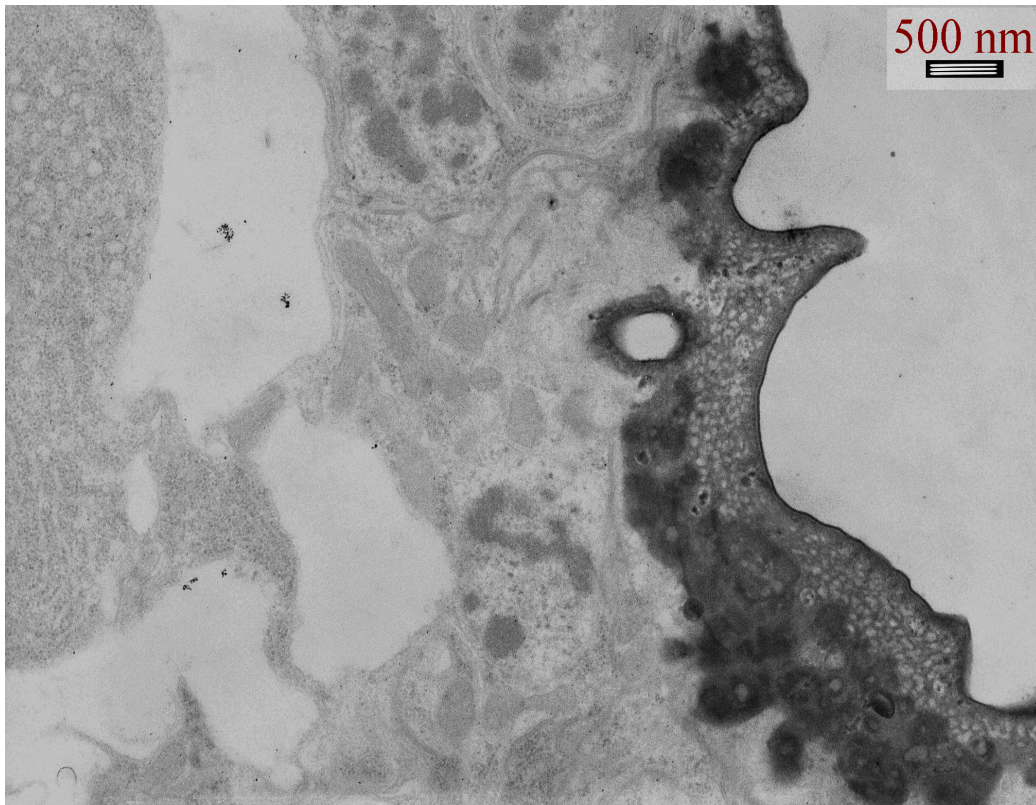


Figura 50. Particolare delle cellule del dotto e del materiale complesso che elaborano e che va a formare la parete del dotto

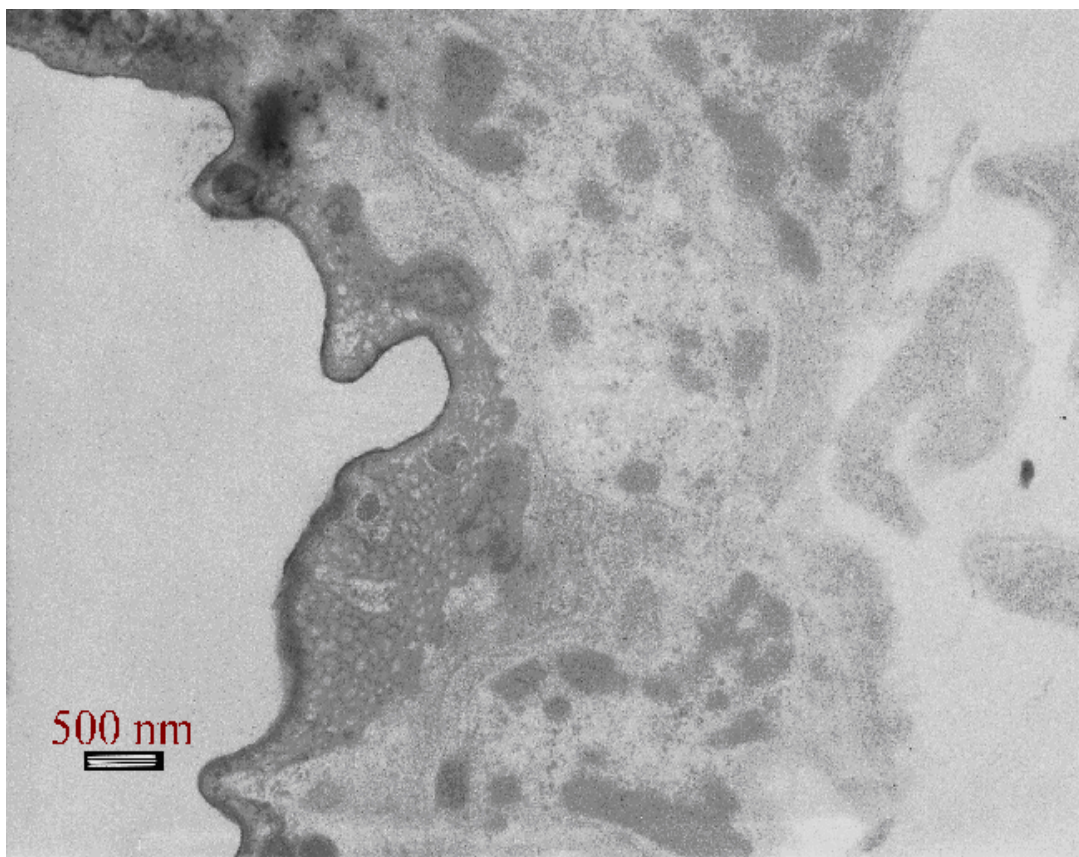


Figura 51. Particolare delle cellule del dotto.

REALIZZAZIONE DI MAPPE DI RISCHIO

L'esigenza di monitorare nell'area di studio alcuni aspetti ambientali, le principali attività antropiche e la presenza dei potenziali vettori di malaria impone di conoscere il territorio con il massimo dettaglio possibile, in modo da poter pianificare strategie per fronteggiare emergenze nell'ambito della salute pubblica (Angeli *et al.*, 2009, Boccolini *et al.*, 2009).

A questo scopo sono state realizzate mappe di "rischio strutturale" per la maremma toscano-laziale che definiscono gli "ambienti sensibili" alla proliferazione di popolazioni di *An. labranchiae* e che comprendono la fascia costiera delle Province di Grosseto e Viterbo, fino a circa 40 di distanza dal mare.

L'immagine satellitare ASTER ben rappresenta le caratteristiche della vegetazione e della copertura del suolo della pianura grossetana: le aree di colore verde evidenziano la pineta presente lungo la fascia costiera e i campi coltivati con colture irrigue; le zone con una colorazione rosso-arancio identificano il suolo nudo, privo di vegetazione. I siti di campionamento 9 (Principina) e 11 (Ampio), si trovano ad una distanza di circa 1,5 km da aree umide artificiali (risaie) e naturali (Diaccia Botrona) (Fig. 52).

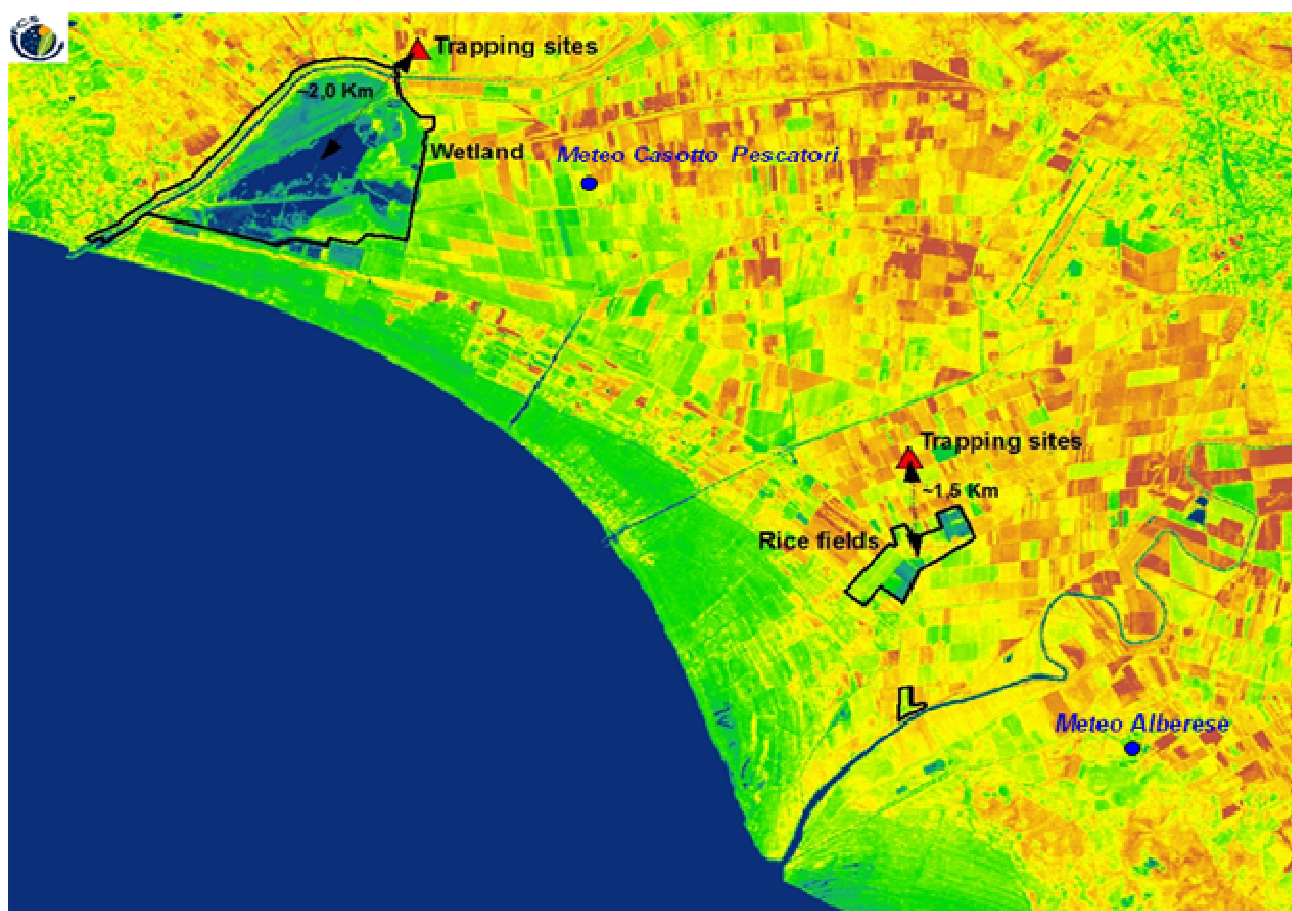


Figura 52. Immagine satellitare ASTER dell'area di studio

I livelli informativi utilizzati (la mappa di uso del suolo, la mappa del reticolo idrografico, il modello digitale del terreno SRTM e la mappa georeferenziata di tutti gli allevamenti zootecnici, localizzati al di sotto dei 300 m s.l.m.) rappresentano i diversi elementi ambientali che influenzano la presenza della specie. La stima quantitativa delle popolazioni degli adulti (indice di infestazione) è messa in relazione alle variabili climatiche e/o ambientali.

A partire dalle informazioni di base dell'uso del suolo e dell'idrografia, opportunamente elaborate, e dopo aver valutato le soglie di temperatura media delle mappe climatiche, fissando a 300 m s.l.m. la quota limite oltre la quale è improbabile individuare la specie, è stata realizzata una prima mappa che riproduce i potenziali focolai larvali e le aree favorevoli allo sviluppo di *An. labranchiae* dal punto di vista termico (Fig. 53).

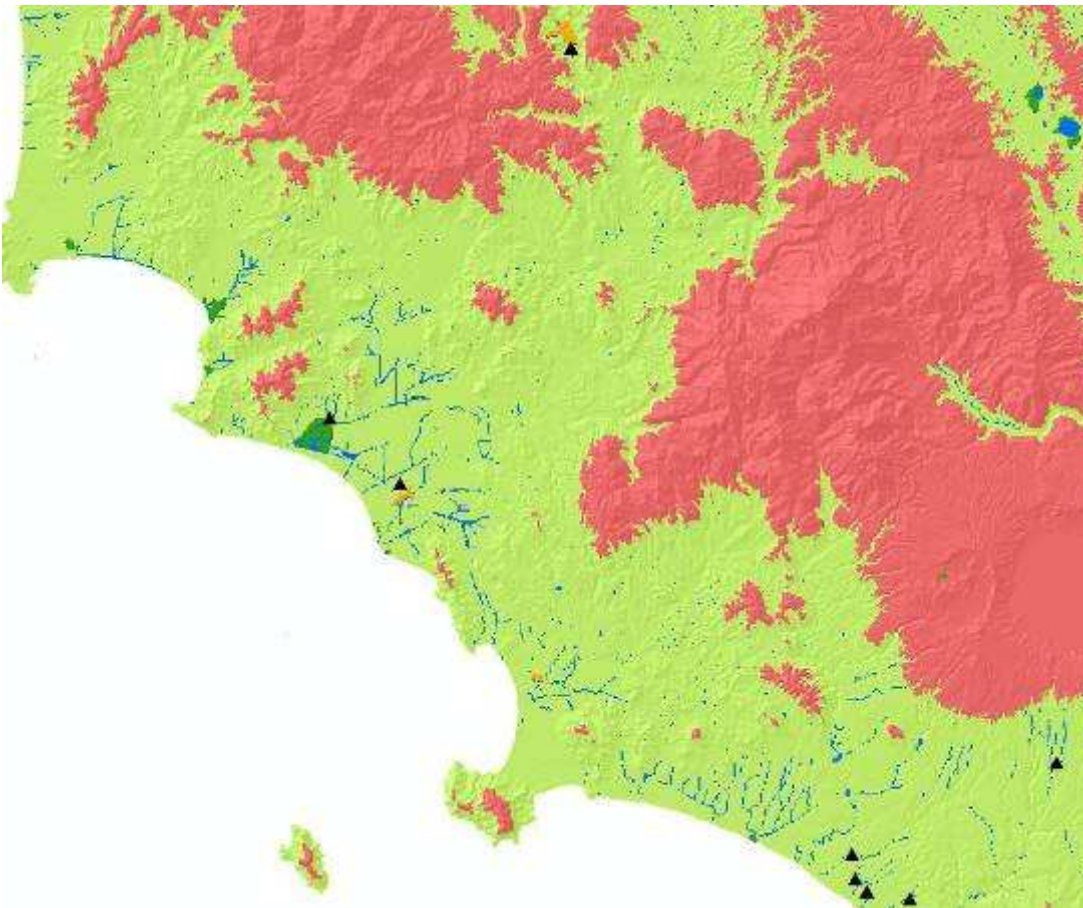


Figura 53. Mappa dei focolai larvali e, in giallo, le aree favorevoli allo sviluppo di *An. labranchiae*.

Per stimare quantitativamente la presenza della specie, è stata ricavata una distanza relativa rispetto a ciascun focolaio larvale. Il dato ottenuto è stato inserito in un modello di calcolo, insieme alle informazioni relative alle risaie, alle aree umide, al reticolo idrografico ed ai corpi idrici. Ogni singolo strato informativo è stato moltiplicato per coefficienti di regressione derivanti da analoghi studi condotti in siti larvali nella regione francese della Camargue (Tran *et al.*, 2008).

Si è ottenuto così un valore, definito indice larvale, che rappresenta la probabilità di avere larve in un sito, almeno una volta in un anno, e tutti i valori relativi ai diversi siti sono stati mappati (Fig. 54).

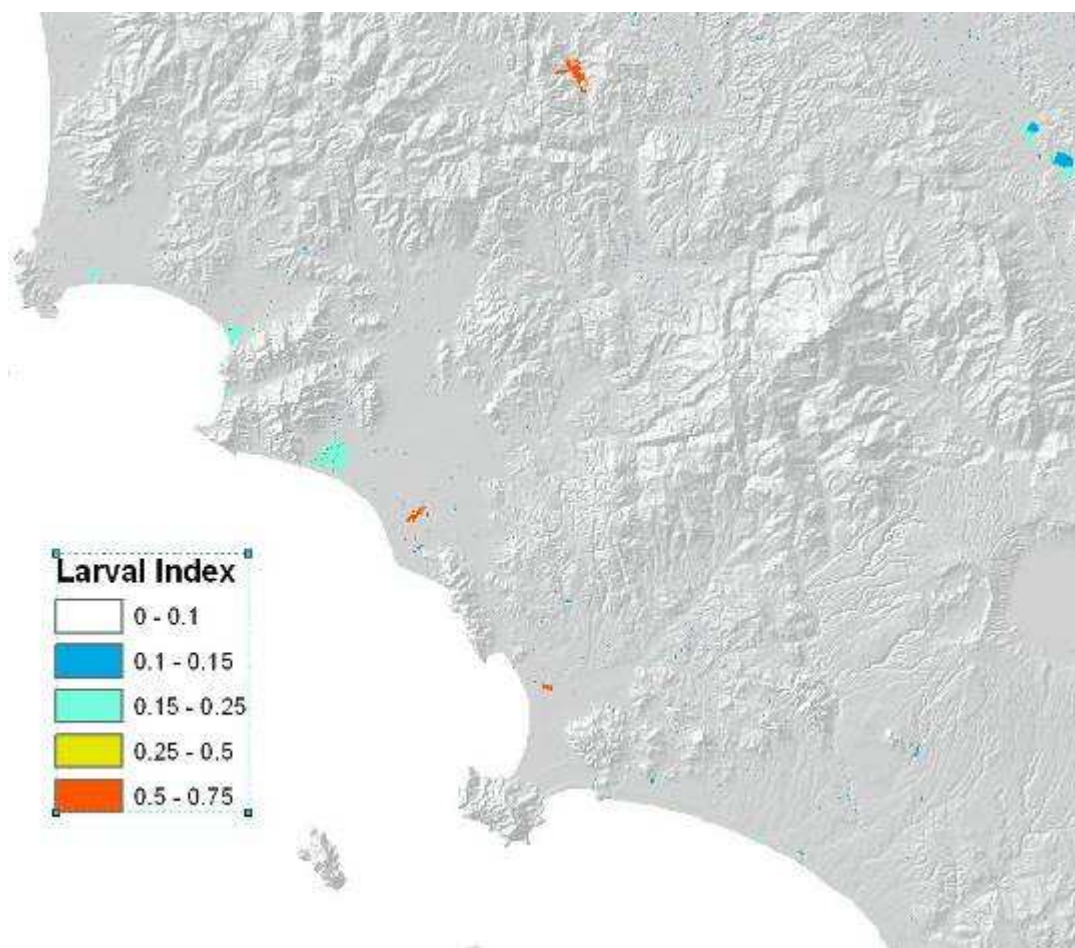


Figura 54. Mappa dell'indice larvale.

I valori di indice larvale sono stati confrontati con le abbondanze massime annuali di catture dei siti di campionamento 2 (Valfragida), 9 (Principina) e 10 (Ampio), permettendo di trovare il valore della distanza dal sito larvale che fosse più coerente con i dati relativi agli adulti osservati (Fig. 55).

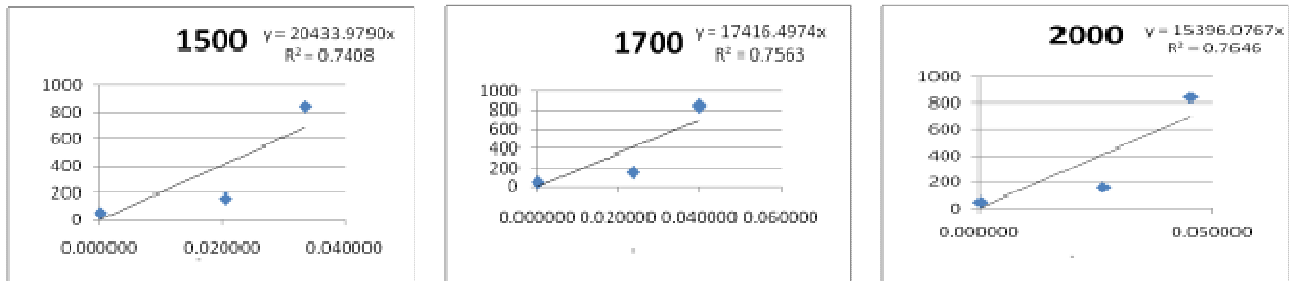


Figura 55. Correlazione tra catture e distanza del sito dalla mappa dell'indice larvale

La distanza che meglio ha correlato i dati osservati è stata quella di 2000 metri. Il coefficiente angolare della retta di regressione, che vale circa 15400, è stato quindi moltiplicato per la mappa dell'indice larvale in modo da ottenere una mappa predittiva della presenza e abbondanza di adulti di *An. labbranchiae* (Fig. 56).

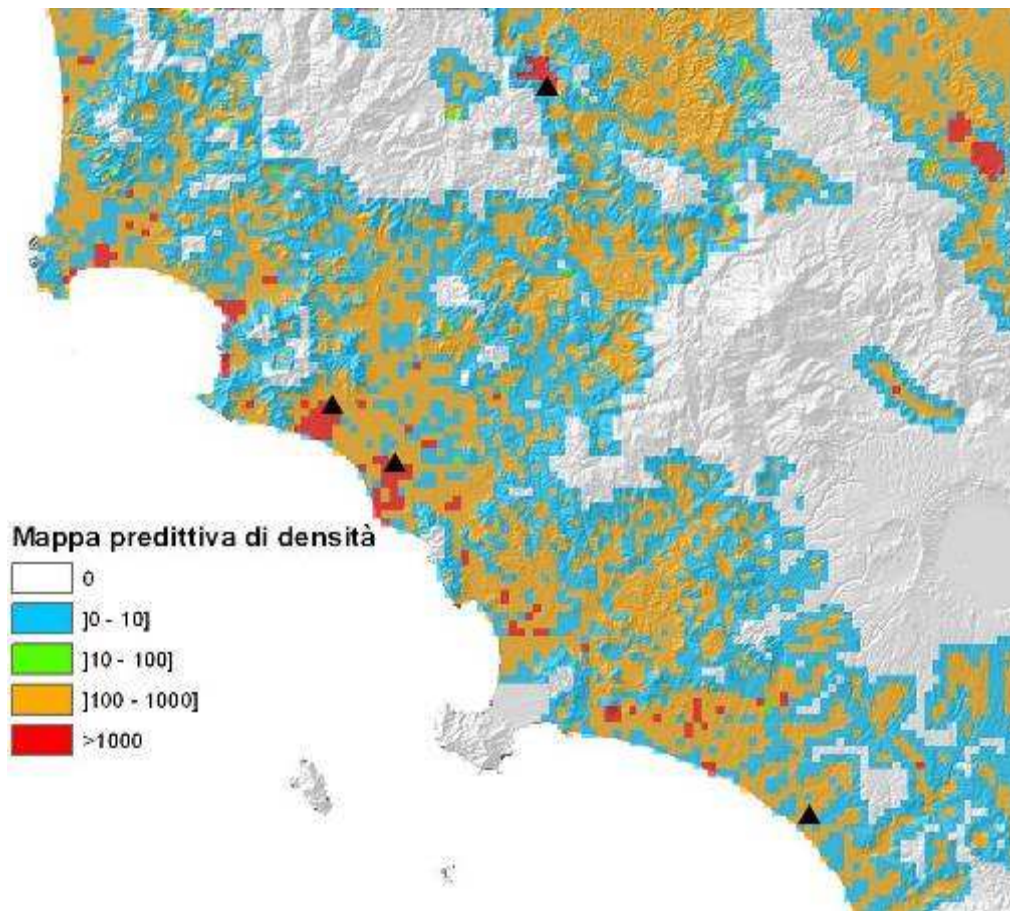


Figura 56. Mappa predittiva di densità di popolazione di *An. labbranchiae*.

Rispetto al lavoro svolto dal gruppo di ricerca francese (Tran *et al.*, 2008) è stato inserito un ulteriore fattore spaziale che tenesse conto della presenza dei siti zootecnici (localizzati nella provincia di Grosseto, al di sotto dei 300 m s.l.m.- Fig. 29) e, quindi, dei potenziali ospiti sui quali gli anofelini potessero pungere ed ha prodotto la mappa predittiva in Figura 57.

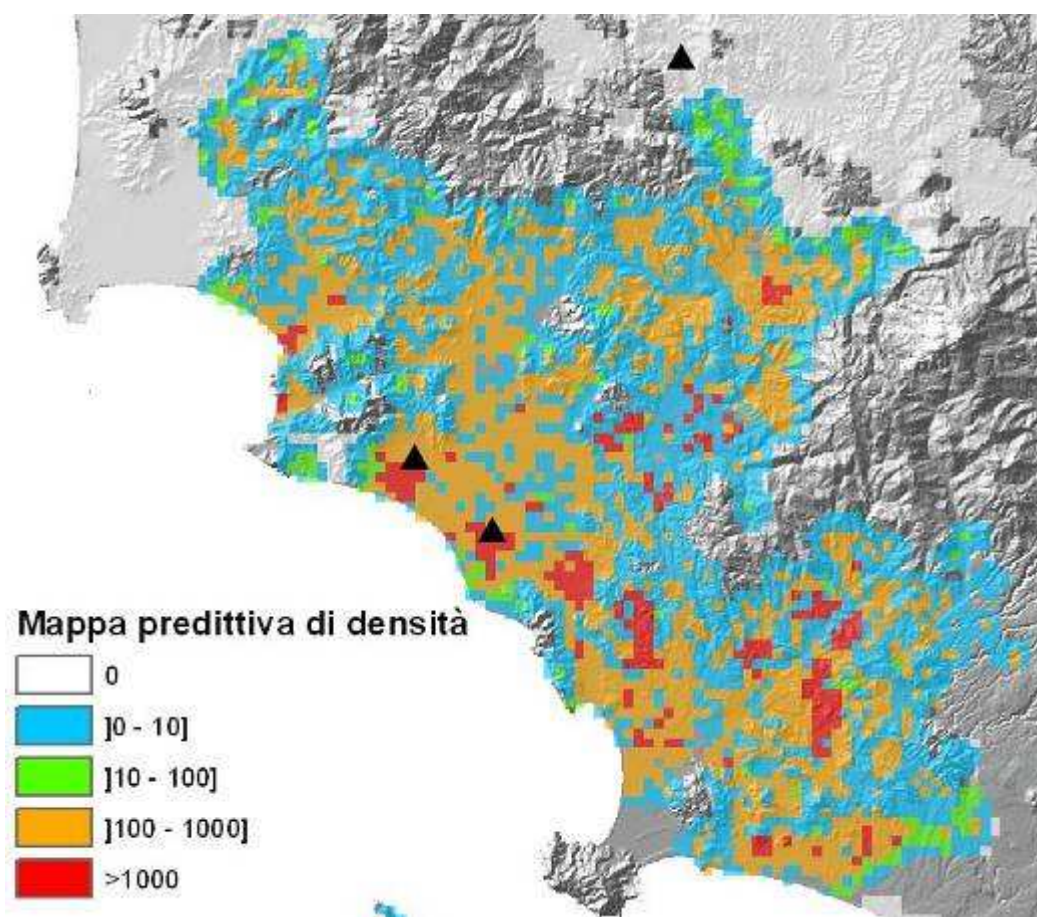


Figura 57. Mappa predittiva di densità di popolazione di *An. labranchiae*. Viene considerato l'indice larvale aggregato con raggio 2 km e la presenza dei siti zootecnici.

REALIZZAZIONE DI MODELLI STATISTICI

E' stato elaborato un modello statistico a regressione logistica per *An. labranchiae* che descrive la dinamica stagionale delle popolazioni della specie presenti presso i siti campionati, determinando i fattori climatici correlati alla loro presenza e che fa previsioni dei livelli di densità della popolazione (Angeli *et al.*, 2009). Questo modello è stato realizzato mettendo in relazione i dati entomologici raccolti nel biennio 2005-2006 nei siti 2 (Valfragida), 9 (Principina), 10 (Ampio) e 11 (Val di Merse) con i parametri atmosferici rilevati dalle stazioni meteorologiche più prossime ai punti di campionamento.

Analisi esplorativa dei dati e delle matrici di correlazione

Dall'analisi esplorativa dei dati, risulta che la popolazione di *An. labranchiae* del sito 9 (Principina), situato in prossimità delle risaie, presente ad alte densità se rapportate ai valori di abbondanza dei siti 2 (Valfragida), 10 (Ampio) e 11 (Val di Merse). Questa differenza rispecchia le caratteristiche geomorfologiche del territorio e la tipologia dei focolai larvali: nel sito 9 le risaie di pianura costituiscono focolai larvali altamente produttivi rispetto ai ristagni del torrente Ampio e alla Diaccia Botrona (sito 10) e ai bacini del Comune di Tarquinia (sito 2). Rispetto al sito 9, anche il sito 11, localizzato in Val di Merse, presenta come principali focolai larvali le risaie, ma qui le differenti condizioni climatiche ed ambientali favoriscono alti livelli di densità di *Anopheles maculipennis s.s.*, mentre la presenza di *An. labranchiae* risulta molto scarsa.

Di seguito è riportato il grafico con le serie temporali delle catture di adulti nei 4 siti per il biennio 2005-2006 (Fig. 58). Questo grafico riporta le serie omogeneizzate su scala settimanale attraverso un'interpolazione lineare dei dati originari. Poiché nel biennio 2007-2008 nella Tuscia laziale la frequenza di campionamento ha avuto cadenza mensile, il grafico relativo non è stato uniformato su scala settimanale (Fig. 59).

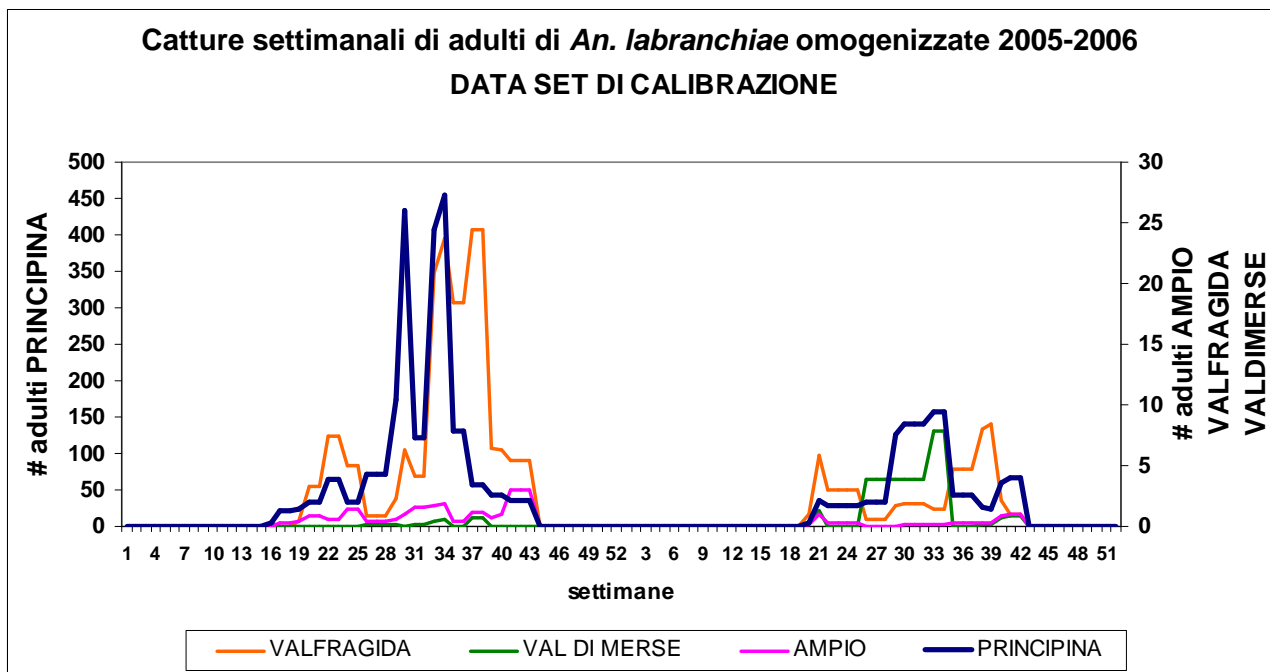


Figura 58. Grafico della serie temporale delle catture di *An. labranchiae* omogeneizzate a scala settimanale nel 2005 e 2006 a Principina, Ampio, Valfragida e Val di Merse.

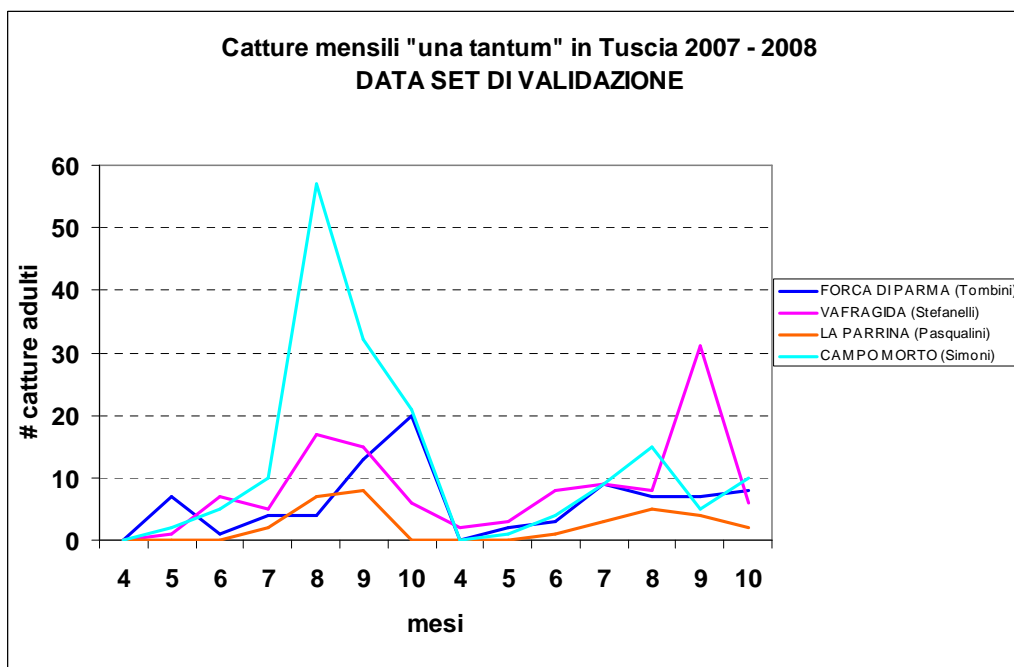


Figura 59. Grafico della serie temporale delle catture di *An. labranchiae* effettuate mensilmente nel 2007 e 2008 in 4 siti presenti lungo la costa laziale, in Provincia di Viterbo.

Successivamente sono stati presi in considerazione, quali fattori meteo-climatici, quelle variabili tra loro ortogonalizzate che meglio spiegassero la gran parte della varianza (predittori termici e psicometrici: sommatoria termica a sette e quindici giorni, accumulo di gradi giorno con soglia 5, 10 e 15 °C, escursione termica media, varianza dell'escursione termica, media delle temperature medie, varianza delle temperature medie, numero di giorni con velocità minima del vento inferiore a 2 metri al secondo calcolata tra le ore 8:00 e le ore 20:00, precipitazione cumulata a 7 e 15 giorni, umidità relativa media e deficit di saturazione medio).

Attraverso l'analisi delle matrici di correlazione è stata fatta una verifica qualitativa su come queste variabili meteorologiche fossero legate al predittando (abbondanza della specie).

Da questa analisi si evince che *An. labranchiae* sembra preferire situazioni ambientali caratterizzate da condizioni atmosferiche stabili, prive di variazioni repentine, elevate temperature prolungate nel tempo, venti relativamente deboli; inoltre lo sviluppo della specie sembra favorito da condizioni di umidità relativa tipica degli ambienti palustri o prossimi ai bacini idrici, ma non troppo elevate, tipiche delle giornate caratterizzate da abbondanti e frequenti precipitazioni.

I risultati del modello statistico prescelto, sia binomiale che multinomiale, costruito a partire dai predittori e dal predittando, vengono illustrati nei grafici riportati nei successivi paragrafi. In questi grafici, i dati delle catture entomologiche sono suddivisi in categorie (0, 1 per il binomiale; 0, 1, 2 per il multinomiale). Le categorie osservate vengono messe a confronto con le probabilità di accadimento di ogni categoria, calcolando tre indici statistici di *skill* che permettono di validare le prestazioni del modello rispetto ai dati reali: l'Hit Rate che indica la probabilità di ottenere previsioni corrette rispetto alla totalità degli eventi; il POD (Probability Of Detection) che valuta quante sono le previsioni corrette rispetto alla totalità degli eventi osservati e FAR (False Alarm Ratio) che determina i falsi allarmi rispetto alla totalità degli eventi previsti. Per una buona previsione l'Hit Rate e POD devono risultare prossimi ad 1, mentre il FAR prossimo a zero.

Sito 9: Principina (calibrazione)

La calibrazione del modello statistico sia di tipo multinomiale che binomiale è stata effettuata con il data-set di catture ottenute nel 2005-2006 nel sito 9, in prossimità delle risaie di Principina (Fig. 60).

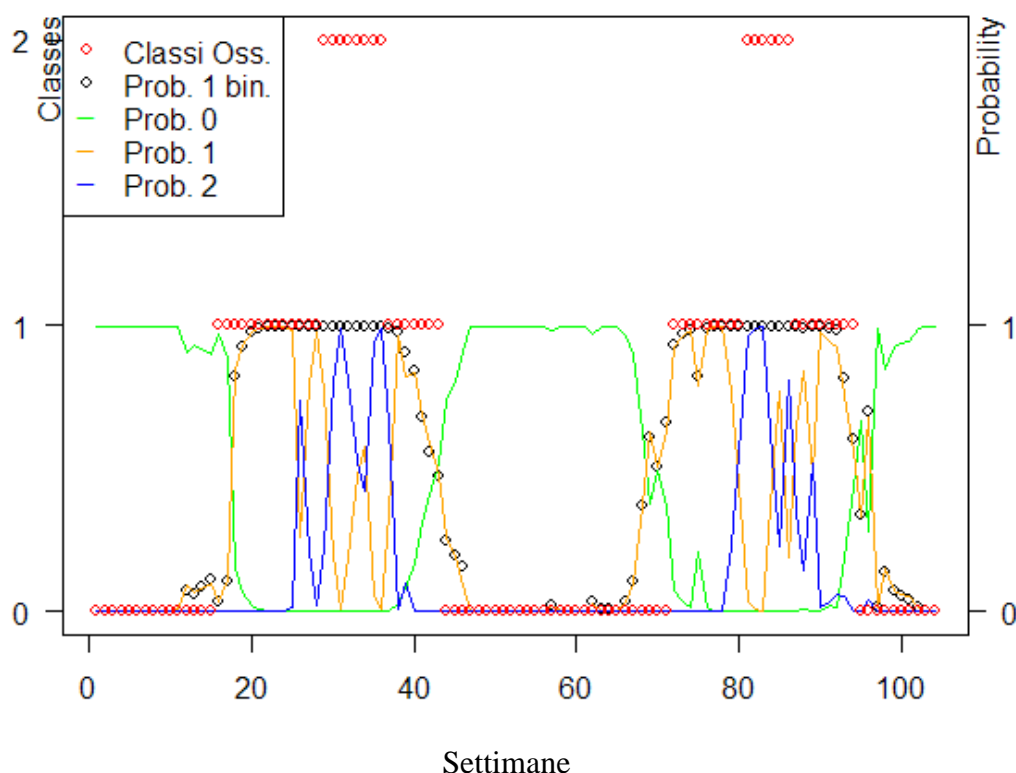


Figura 60. Grafico delle categorie osservate messe a confronto con le probabilità di accadimento per il sito 9 durante il biennio 2005-2006.

Modello multinomiale (0; 1-60; >60)								
	oss 0	oss NO 0		oss 1	oss NO 1		oss 2	oss NO 2
prev 0	49	3	prev 1	30	7	prev 2	11	4
prev NO 0	4	48	prev NO 1	7	60	prev NO 2	3	86
tot eventi	104		tot eventi	104		tot eventi	104	
HIT RATE	0.93		HIT RATE	0.87		HIT RATE	0.93	
POD	0.92		POD	0.81		POD	0.79	
FAR	0.06		FAR	0.19		FAR	0.27	

Tabella 13. Tabella di contingenza e relativi indici di *skill*.

Per questo sito gli indici di *skill* ottenuti dal processo di calibrazione mostrano un buon risultato, riuscendo a discriminare la categoria 0 (assenza della specie) con un POD del 92%, la categoria 1 (abbondanza compresa tra 1 e 60 esemplari) con un POD dell'81% e la categoria 2 (> 60 esemplari) con un POD del 79%. Anche il FAR presenta valori molto buoni, ovvero prossimi a zero (Tab. 13).

Sito 10: Ampio (calibrazione)

La calibrazione del modello statistico sia di tipo multinomiale che binomiale è stata effettuata con il data-set di catture ottenute nel 2005 - 2006 nel sito 10, in prossimità del torrente Ampio (Fig. 61).

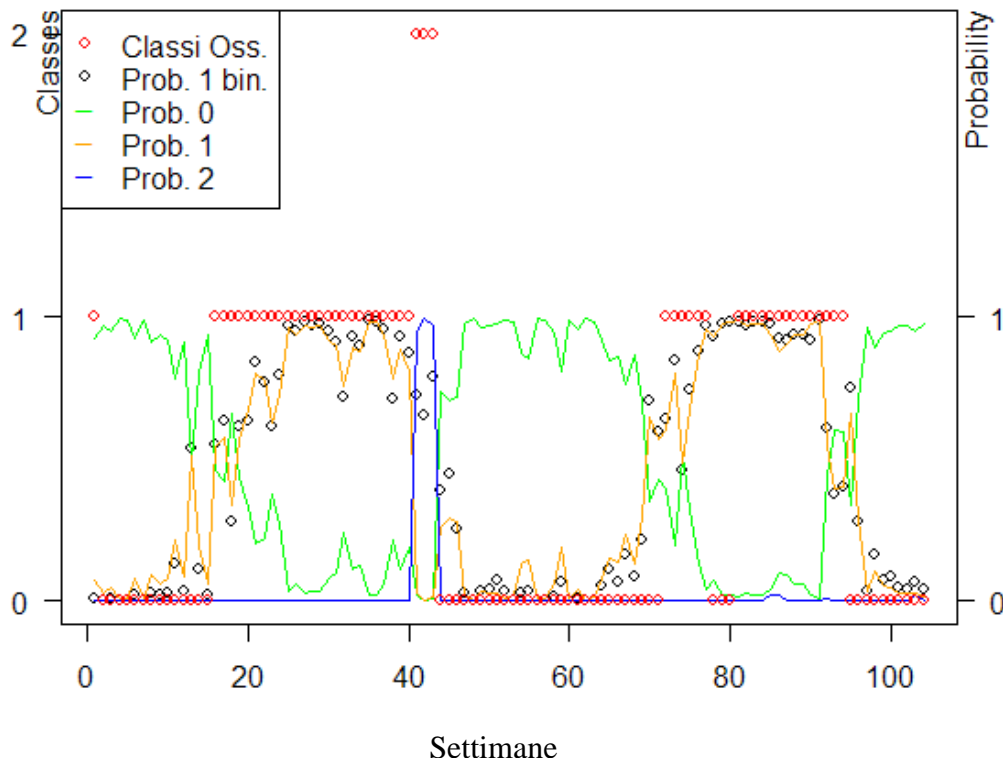


Figura 61. Grafico delle categorie osservate messe a confronto con le probabilità di accadimento per il sito 10 durante il biennio 2005-2006.

Modello binomiale (presenza/assenza 1-60)							
			oss 1	oss 0			
	prev 1		44	7			
	prev 0		4	49			
	tot eventi		104				
	HIT RATE		0.89				
	POD		0.92				
	FAR		0.14				
Modello multinomiale Modello multinomiale (0; 1-50; >50)							
	oss 0	oss NO 0	oss 1	oss NO 1	oss 2	oss NO 2	
prev 0	48	5	prev 1	41	7	prev 2	3
prev NO 0	7	4	prev NO 1	5	51	prev NO 2	0
tot eventi	104		tot eventi	104		tot eventi	104
HIT RATE	0.88		HIT RATE	0.88		HIT RATE	1
POD	0.87		POD	0.89		POD	1
FAR	0.09		FAR	0.15		FAR	0

Tabella 14. Tabella di contingenza e relativi indici di skill.

Per questo sito gli indici di *skill* ottenuti dal processo di calibrazione mostrano un risultato più che soddisfacente, sia per il modello binomiale che per quello multinomiale (Tab. 14).

Sito 11: Val di Merse (calibrazione)

La calibrazione del modello statistico di tipo binomiale è stata effettuata con il data-set di catture ottenute nel 2005 – 2006 nel sito 11, in prossimità delle risaie della Val di Merse e di un tratto dell'omonimo fiume (Fig. 62).

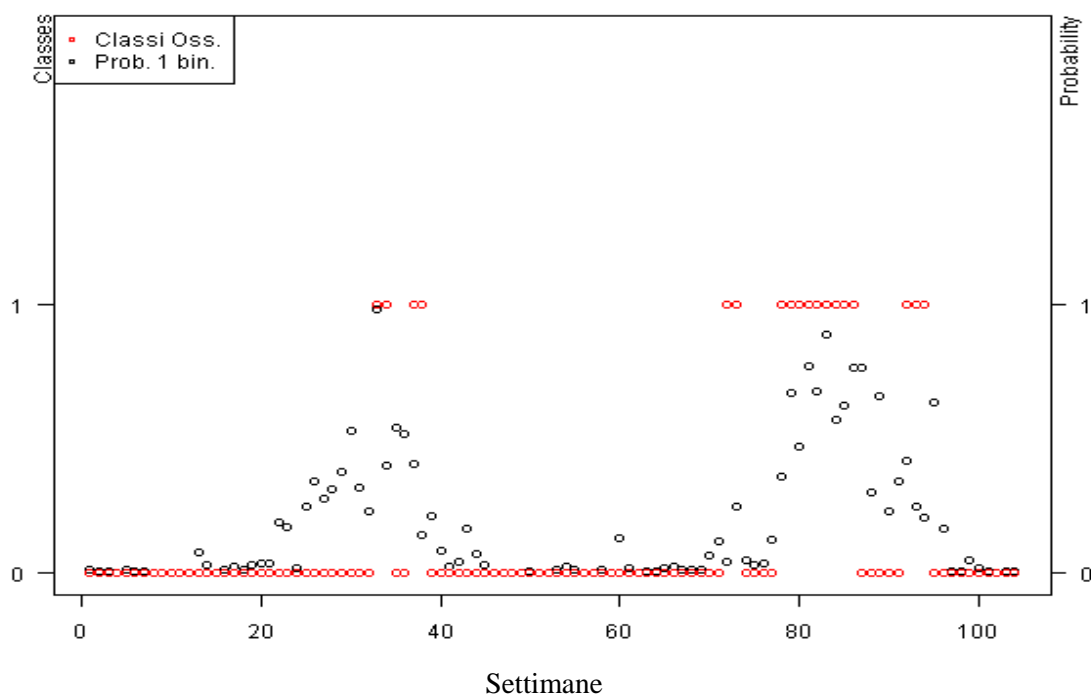


Figura 62. Grafico delle categorie osservate messe a confronto con le probabilità di accadimento per il sito 11 durante il biennio 2005-2006.

Modello binomiale (presenza/assenza 1-60)			
	oss 1	oss NO 1	
prev 1	8	6	
prev NO 1	10	80	
tot eventi	104		
HIT RATE	0.85		
POD	0.44		
FAR	0.43		

Tabella 15. tabella di contingenza e relativi indici di *skill*.

Per questo sito gli indici di *skill* ottenuti dal processo di calibrazione mostrano un risultato abbastanza soddisfacente, benché i valori di catture registrati risultino piuttosto bassi (Tab. 15).

Sito 2: Valfragida (calibrazione e validazione)

La calibrazione del modello statistico di tipo binomiale è stata effettuata con il data-set di catture ottenute nel 2005 - 2006 nei pressi del sito 2, in località Valfragida, presente lungo la costa laziale tra Tarquinia e Montalto di Castro (Fig. 63).

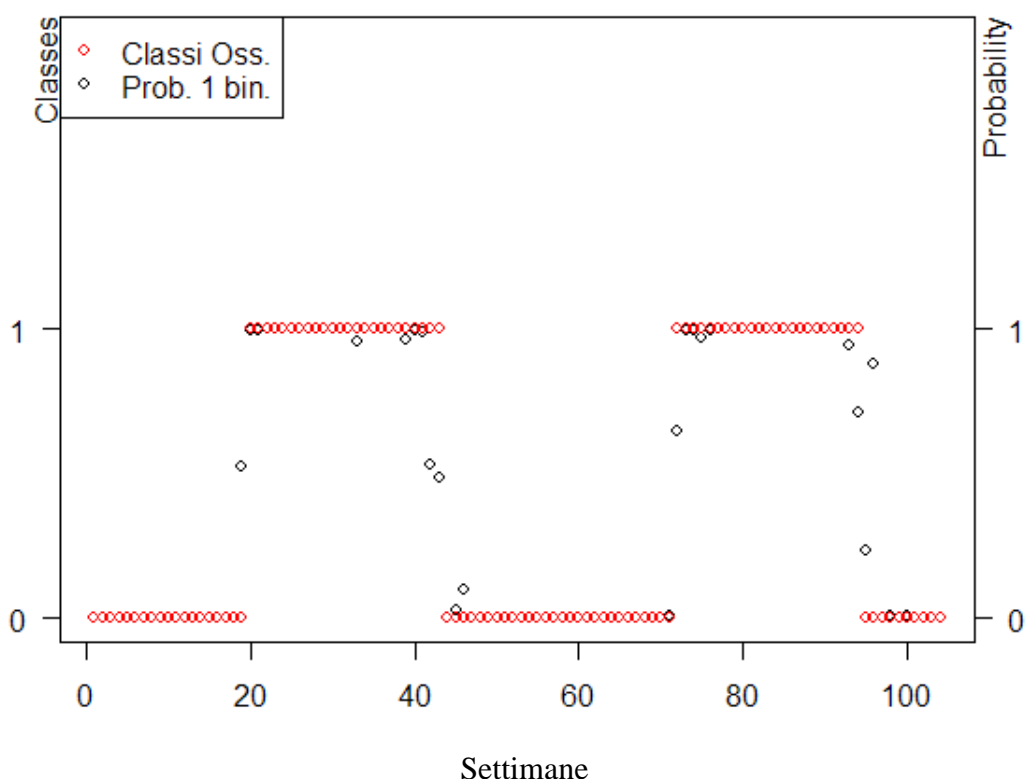


Figura 63. Grafico delle categorie osservate messe a confronto con le probabilità di accadimento per il sito 2 durante il biennio 2005-2006.

Modello binomiale (presenza/assenza 1-60)		
	oss 1	oss 0
prev 1	44	0
prev 0	0	60
tot eventi	104	
HIT RATE	1.00	
POD	1.00	
FAR	0.00	

Tabella 16. Tabella di contingenza e relativi indici di *skill*.

Gli indici di *skill* ottenuti dal processo di calibrazione mostrano un risultato più che soddisfacente (Tab. 16).

Inoltre per questo sito, disponendo di ulteriori dati provenienti dalle catture effettuate mensilmente tra aprile e ottobre nel biennio 2007-2008, è stato possibile effettuare una validazione del modello (Tab. 17).

	settimane	anoph_bin_oss	anoph_oss	anoph_bin_prev
2007	16	0,00	0,00	0,00
	20	0,00	1,00	1,00
	25	1,00	7,00	1,00
	29	1,00	5,00	1,00
	33	1,00	17,00	1,00
	38	1,00	15,00	1,00
	42	1,00	6,00	0,00
2008	16	0,00	2,00	0,00
	20	1,00	3,00	1,00
	25	1,00	8,00	1,00
	29	1,00	9,00	1,00
	33	1,00	8,00	1,00
	38	1,00	31,00	1,00
	42	1,00	6,00	1,00

Tabella 17. Confronto tra categorie osservate e quelle previste nel sito di Valfragida per il biennio 2007-2008.

Modello binomiale (presenza/assenza 1-60)			
		oss 1	oss 0
	prev 1	9	1
	prev 0	0	4
	tot eventi	14	
	HIT RATE	0.93	
	POD	1.00	
	FAR	0.10	

Tabella 18. Tabella di contingenza e relativi indici di *skill*.

I risultati espressi dagli indici di *skill* sono più che soddisfacenti con soli due errori su 14 e con un successo dell'85.7%, anche se l'impiego di un numero più consistente di dati potrebbe rendere i risultati maggiormente affidabili (Tab. 18).

DISCUSSIONE

Sulla base dei risultati qui riportati e alla luce della letteratura scientifica analizzata, è possibile delineare quale sia, ad oggi, la possibilità di reintroduzione della malaria nell'area di studio, la Maremma.

Le specie anofeliche appartenenti al complesso *An. maculipennis* sono state rinvenute in tutta l'area di studio. Sia la composizione di specie, che le densità e le dinamiche stagionali sono risultate diverse in relazione ai biotopi, alle attività antropiche e ai fattori climatici caratteristici di ciascun sito di studio.

An. labranchiae è la specie predominante nella Maremma toscana, in particolare nei siti 9 e 10 (>98%). La specie risulta comunque prevalente lungo tutta la fascia costiera (siti da 1 a 5), fino al limite sud dell'area di studio, nella Maremma laziale (69%-91%), dove però la specie non raggiunge mai densità elevate, confrontabili con la porzione toscana. In particolare, nella piana del grossetano, le risaie che rappresentano i principali focolai larvali perché alimentate da un costante e continuo apporto di acqua, consentono alla specie di raggiungere densità epidemiologicamente importanti (sito 9). Tali densità non vengono mai raggiunte in altre zone dell'area di studio, dove i siti riproduttivi dipendono principalmente dalle precipitazioni. Nel sito 10, nelle vicinanze del luogo in cui si verificò il caso di malaria autoctono nel 1997, la popolazione di *An. labranchiae* è mantenuta a medie densità, sostenute dalla vicinanza del Padule della Diaccia Botrona. Quest'area naturale rappresenta l'originario habitat e l'abbondanza di acqua e la ricca vegetazione lacustre permettono la proliferazione delle larve, le cui densità sono comunque regolate dalla presenza di numerosi predatori naturali (pesci, anfibi, uccelli, insetti etc.).

Nel sito 11, collocato a nord-est dell'area di studio, nell'alta valle del fiume Merse, a circa 300-400 m s.l.m., le differenti condizioni ambientali favoriscono un rilevante sviluppo dell'altra specie, *An. maculipennis s.s.*, mentre *An. labranchiae* rappresenta solo 1-3% del campione analizzato. La stessa situazione si presenta anche nella porzione laziale dell'area di studio (siti 6, 7 e 8), dove *An. maculipennis s.s.* risulta la specie dominante, ma dove tuttavia nel 2007 sono stati rinvenuti esemplari di *An. labranchiae* (11% nel sito 6, 16% nel sito 7 e 9% nel sito 8). Tuttavia, queste piccole frazioni di popolazioni di *An. labranchiae* rappresentano nuove e inattese testimonianze della specie in queste aree interne, rispetto alla distribuzione finora nota. Questo risultato è ulteriormente avvalorato dagli esemplari di *An. labranchiae* rinvenuti durante sporadiche indagini entomologiche condotte nell'entroterra del grossetano nel luglio 2006 (16% a Cinigiano e Casenovole) e in Umbria sia nel 2003 a Fabro-Alviano (13%) che nel 2008 a Narni (5%). *An.*

melanoon è stato trovato sporadicamente sul territorio (con percentuali che oscillano tra l'1% e il 3.9%) e mai modo continuativo. *An. atroparvus*, vicariante settentrionale di *An. labranchiae*, è stato rinvenuto nell'area di studio una sola volta nel sito 9 nel 2006, ma la sua presenza in aree più interne è testimoniata dai ritrovamenti nel 2006 a Cinigiano e Casenovole, località collinari del grossetano, poste lungo il pendio di Monte Antico, al confine con la provincia senese, e nel 2003, a Fabro, cittadina umbra a 364 m s.l.m.

Le analisi condotte per la realizzazione di mappe di rischio "strutturale" hanno permesso di identificare le aree che mostrano un'elevata potenzialità per la presenza *An. labranchiae*. In particolare intorno alle risaie e alle aree umide, come confermato dalle indagini entomologiche, si riscontrano le maggiori densità previste della specie. Ma la mappa prodotta, oltre a confermare il dato ottenuto nell'area di studio (Principina ed Ampio), pone in evidenza altre aree a rischio, soprattutto nei pressi delle prime propaggini collinari di Magliano e Scansano e lungo la valle dell'Albegna, che dovrebbero essere oggetto di sorveglianza entomologica.

Inoltre, nell'ottica di una corretta gestione delle emergenze sanitarie, è importante sottolineare che la scelta di utilizzare, come livelli informativi, l'uso del suolo, la rete idrografica, ma soprattutto quello relativo alla presenza e localizzazione dei siti zootecnici, si è dimostrata estremamente valida nell'elaborazione della mappa di rischio della Maremma. Infatti, rispetto a quanto emerso in studi condotti nella grande area naturale del sud della Francia, la Camargue, dove i potenziali focolai larvali (numerosa risaie ed un'area umida molto estesa) sono distribuiti sul territorio in maniera continua ed omogenea, in Maremma tali ambienti sono più localizzati e distribuiti "a mosaico". Inoltre disponendo di informazioni relative, non solo alla localizzazione, ma anche al tipo di allevamento del bestiame (specie allevate e numero di capi), sarà possibile elaborare in futuro mappe che evidenzino differenze nella diffusione di zanzare in presenza di allevamenti differenti. Inoltre le buone prestazioni realizzate dai modelli statistici nel descrivere i livelli di abbondanza della specie nei vari siti, in relazione alle variabili meteo-climatiche, avvalorano la convinzione di aver utilizzato l'approccio statistico adeguato agli obiettivi della ricerca. Le fluttuazioni stagionali di popolazioni di *An. labranchiae* lungo l'intera pianura maremmana, seguono un *trend* termofilico, tipico dell'ecologia della specie, come dimostrato anche dall'andamento della parità nella popolazione di *An. labranchiae* di Principina (sito 9) e come già confermato in precedenti studi condotti in questa area negli anni '90. I bassi valori di giugno riflettono la presenza di giovani popolazioni, ancora a bassi livelli di densità; in luglio l'aumento dei valori di parità sono coerenti con l'incremento delle popolazioni, mentre ad agosto i valori di parità più elevati coincidono con il picco di abbondanza numerica.

L'attività trofica di *An. labranchiae* e di *An. maculipennis s.s.* si esplica dal crepuscolo all'inizio della notte, concentrandosi maggiormente nelle prime ore dopo il tramonto. Dalle catture notturne condotte su uomo *An. labranchiae* è risultata una specie molto aggressiva, ma è interessante notare che anche *An. maculipennis s.s.*, specie considerata prettamente zoofila, è molto attratta dall'uomo, anche in presenza di altri animali. Dall'analisi dei pasti di sangue *An. labranchiae* si nutre su un'ampia gamma di ospiti, dai piccoli volatili domestici ai mammiferi, mostrando una preferenza per quelli di grossa taglia, a seconda della tipologia degli allevamenti presenti. Nonostante l'alto numero degli animali presenti nei siti considerati sono stati rinvenuti comunque esemplari che si erano nutriti sull'uomo (4 su un totale di 282 pasti analizzati). A conferma del carattere spiccatamente antropofilo di questa specie, la discrepanza tra risultati dell'analisi dei pasti e delle catture notturne su uomo rimane solo apparente, poiché l'uomo di norma risulta poco accessibile, proteggendosi con vestiti, repellenti e zanzariere, ed è quindi meno esposto alla puntura delle zanzare nelle ore in cui è massima l'attività trofica del vettore, cioè la sera e la notte.

Il pasto di sangue, il cui apporto proteico risulta essenziale in tutti gli insetti ematofagi per la maturazione delle uova, sembra attivare un particolare organo dell'apparato riproduttore femminile, la ghiandola accessoria, come evidenziato dallo studio ultrastrutturale, condotto qui per la prima volta su specie del genere *Anopheles*, anche se in realtà per gli altri generi di culicidi la letteratura risulta estremamente scarsa e datata. Questa ghiandola, attivamente secretoria, aumenta di volume subito dopo il pasto, mantenendo dimensioni invariate durante la fase digestiva e di maturazione delle uova, per poi diminuire subito dopo la deposizione. Poiché il dotto di questa ghiandola è parallelo e localizzato a monte del dotto della spermateca, si può ipotizzare che le uova, durante il loro passaggio nella vagina, vengano bersagliate dal materiale secreto dalla ghiandola, contemporaneamente all'emissione degli spermatozoi. Questo materiale di secrezione verrebbe pompato nella vagina grazie alle cellule muscolari che avvolgono il dotto della ghiandola. Quali siano i componenti del secreto e la sua funzione saranno oggetto di ulteriori studi di caratterizzazione biochimica e molecolare, anche se al momento si può ipotizzare un suo ruolo nella biologia riproduttiva, e in particolare nell'attivazione degli spermatozoi o nell'apertura del micropilo nell'uovo. La ghiandola accessoria potrebbe presentare un certo valore tassonomico, almeno tra le specie oggetto di questo studio, infatti, pur mantenendo una struttura analoga, esiste una significativa variabilità nelle dimensioni tra le tre specie di *Anopheles*: in particolare, in *An. maculipennis s.s.* la ghiandola possiede dimensioni maggiori rispetto a quella di *An. labranchiae*, mentre *An. stephensi* presenta, in assoluto, la ghiandola più piccola. Inoltre l'osservazione di questa ghiandola al microscopio ottico, contestualmente al classico esame degli ovaroli (Detinova, 1962),

permette di analizzare la parità in una popolazione, in quanto le femmine pare, anche dopo la deposizione delle uova, mostrano una ghiandola di dimensioni maggiori rispetto alle femmine nullipare.

Per quanto riguarda il rischio di un'eventuale reintroduzione della malaria in Maremma, dalle caratteristiche differenziali delle due specie plasmodiali e dai fattori climatici e morfologici dell'area di studio, si può ipotizzare che lungo la fascia costiera (< 100 m s.l.m.) la stagione potenzialmente favorevole alla trasmissione vada dall'inizio di giugno alla fine settembre, con una prevalenza di casi importati da *P. vivax* tra l'inizio di giugno e metà agosto e un leggero slittamento stagionale per quelli *P. falciparum*, (tra gli inizi di luglio e la fine di settembre). Invece, nelle zone collinari dell'entroterra, la stagione idonea alla trasmissione risulterebbe più breve (da fine giugno a fine di agosto). I presupposti perché ciò avvenga possono essere valutati dall'analisi del potenziale malariogenico, attraverso la stima dei tre parametri che lo determinano, cioè la recettività, l'infettabilità e vulnerabilità dell'area. I risultati del presente studio, suffragati dalla letteratura, dimostrano che l'area di studio è molto recettiva per la presenza di *An. labranchiae*, che in alcune aree raggiunge spesso densità cospicue. Inoltre questa specie mostra valori teorici di capacità vettrice molto elevati: nel sito di Principina (9), questi valori, per il mese di luglio, sono compresi tra 5 e 10, per entrambe le specie plasmodiali, mentre ad agosto, tra 2 e 4 per *P. falciparum* e 3 e 5 per *P. vivax*.

Relativamente all'infettabilità di *An. labranchiae*, questa specie risulta suscettibile a ceppi tropicali di *P. vivax*, come confermato, nel 1997, dal caso di malaria autoctono. Probabilmente questa specie presenta una potenziale, anche se bassa, competenza a trasmettere ceppi tropicali di *P. falciparum*, come testimoniato in recenti esperimenti effettuati con popolazioni di *An. labranchiae* provenienti dal sito di Principina (9) e raccolte in tempi diversi. Nel 2007 sono stati condotti cinque tentativi di infezione di *An. labranchiae*, proveniente dal sito di Principina (9), con *P. falciparum* (ceppo di laboratorio NF54), inducendo le zanzare a pungere su un apparato artificiale, presso i laboratori del Medical Centre dell'Università di Nijmegen (Paesi Bassi). Questi esperimenti hanno evidenziato lo sviluppo del parassita fino alla fase di oocisti in 3 esemplari sui 35 sopravvissuti e dissezionati (8.6%), dimostrando che la specie si infetta col plasmodio (Boccolini *et al.*, 2008). Nel 2008 presso il Centre de Production et d'infection des *Anophèles*, dell'Istituto Pasteur di Parigi, sono state effettuate tre prove che hanno dato una prevalenza media di infezione del 29.3% e un numero medio di 0.4 oocisti per zanzara. Nel 2009, quattro esperimenti successivi hanno prodotto una prevalenza media di infezione del 7% e un numero medio di 0.08 oocisti. Poiché nessuna zanzara infettata è sopravvissuta, non è stato possibile osservare il completamento del ciclo con la

localizzazione finale degli sporozoiti di *P. falciparum* nelle ghiandole salivari, che avrebbe dimostrato la capacità infettante della popolazione di *An. labranchiae* di Principina (Boccolini *et al.*, *submitted*). Attualmente sono in fase di processamento alcuni degli esemplari dissezionati nel 2009 per evidenziare con tecniche molecolari la presenza degli sporozoiti nelle ghiandole salivari.

Per quanto riguarda il numero dei casi importati in Italia nell'ultimo decennio, dopo un picco di casi nel 1999 (1083 casi), si è registrata una tendenza verso una graduale diminuzione, sia tra italiani che tra immigrati (dai 977 casi del 2000 ai 630 casi del 2006, con circa una diminuzione dell'8-10% per anno) (Romi *et al.*, 2002, Boccolini *et al.*, 2007). In particolare, in Toscana dei 241 casi importati notificati tra il 2000 e il 2004, 31 (13%) erano portatori di gametociti; di questi, 8 erano presenti nell'area di studio (provincia di Grosseto) e solo 5 nel periodo favorevole alla trasmissione (tra giugno e ottobre). Quindi la vulnerabilità dell'area di studio risulta estremamente bassa per lo scarso numero di casi in cui è comprovata la presenza di gametociti, nel periodo favorevole alla trasmissione (con una media 1 portatore di gametociti/anno) (Romi *et al.*, 2006).

E' necessario però sottolineare che il numero di notifiche dei casi importati potrebbe rappresentare una sottostima della situazione reale, in quanto, in alcune regioni del Centro e del Sud d'Italia non vengono registrati tutti i casi di malaria, soprattutto tra gli immigrati, e in particolare tra quelli irregolari. Inoltre, benché confermata la riduzione dei casi importati tra gli immigrati, essi rappresentano ancora circa i $\frac{3}{4}$ della totalità dei casi importati. Infatti, gli immigrati, mentre nel decennio precedente rappresentavano solo il 15% dei casi importati, nel 2002-2006 rappresentano circa il 75% (Boccolini *et al.*, 2007). Rispetto agli italiani che visitano zone a rischio malarico per turismo o per lavoro, molti tra gli immigrati tendono ancora ad ignorare o a sottostimare il rischio di contrarre la malaria. Essi sono prevalentemente africani, che, lavorando e risiedendo stabilmente in Italia, perdono l'immunità acquisita nelle aree endemiche; quando tornano nei paesi di origine, in visita a parenti e familiari, spesso senza ricorrere ad alcuna profilassi o effettuandola solo in modo non corretto, incorrono nel rischio di infettarsi e di tornare ammalati in Italia.

CONCLUSIONI

Nonostante i risultati abbiano chiaramente evidenziato un'elevata recettività e alti valori di capacità vettrice limitatamente all'area di Principina (sito 9), l'intera Maremma può essere considerata un territorio a rischio di reintroduzione della malaria, così come riportato anche per altre regioni recentemente investigate dell'Europa mediterranea, quali la Camargue nel sud della Francia.

In questo contesto, la Maremma, e più in generale l'Italia, rappresentano sicuramente il modello di studio più idoneo poiché *An. labranchiae*, il vettore di malaria più efficiente quando questa infezione era endemica nei paesi dell'Europa occidentale, è ancora ampiamente diffuso nel nostro paese. Questa specie, per quanto riguarda l'Italia Centrale, sta probabilmente estendendo il suo areale verso nord-est, attraverso le zone collinari della Toscana, Umbria e Lazio, come evidenziato dai risultati di questo studio. In passato si pensava che i bassi livelli di trasmissione della malaria di queste aree fossero mantenuti unicamente da altre specie del complesso, *An. atroparvus* e/o *Anopheles messeae*. I dati raccolti, comunque, non consentono ancora di stabilire se l'espansione di *An. labranchiae* verso le aree interne sia l'effettiva conseguenza della lotta antimalarica o dei recenti cambiamenti climatici o se questa specie sia stata sempre presente in queste zone, ma mai rilevata in passato per la difficoltà di identificarne le uova in modo univoco. Infatti, l'estrema variabilità nel pattern di ornamentazione dell'esocorion rende difficile la diagnosi di questa specie rispetto alle altre due del complesso, soprattutto quando rinvenute in simpatria, problema oggi risolto con l'uso della diagnosi molecolare.

L'impiego di metodologie GIS ha permesso di elaborare una mappa della presenza di *An. labranchiae* che ci permette di fare previsioni sulla diffusione del vettore in base alle differenti caratteristiche naturali e a quelle ambientali, determinate dalle attività antropiche. Inoltre è stato elaborato un valido modello statistico capace di dimostrare la stretta correlazione tra densità di *An. labranchiae* e alcuni dei parametri climatici che, in base alla letteratura e all'esperienza acquisita negli anni, erano stati scelti come fattori determinanti per l'ecologia del vettore.

Si ritiene comunque che sia il modello che la mappa di rischio abbiano ulteriori margini di implementazione, soprattutto per il loro impiego predittivo. E' necessario, infatti, dotarsi di mappe di rischio che prevedano l'impatto del riscaldamento globale sulla demografia di potenziali vettori, con riferimento a possibili scenari climatici. Questo strumento può risultare di fondamentale importanza per la salute pubblica, soprattutto in caso di emergenze sanitarie.

In conclusione, 60 anni dopo l'eradicazione della malaria in Italia, il potenziale maloriogenico presenta valori sufficientemente bassi da rendere improbabile, ma non impossibile, la reintroduzione di questa malattia in forma endemica. Non è da escludere, infatti, che sporadici e

isolati casi di *P. vivax* (come quello avvenuto nel 1997) o perfino piccole e localizzate epidemie possano verificarsi in aree rurali dell'Italia centrale, in cui condizioni climatiche e densità del vettore risultino favorevoli a questo evento, insieme alla contestuale presenza di portatori di gametociti, i cui numeri riportati ufficialmente sono in realtà sottostimati. Inoltre, andrebbe approfondita a livello sperimentale l'eventualità che un continuo contatto di ceppi plasmodiali afro-tropicali con i potenziali vettori autoctoni possa favorire la selezione o l'adattamento di ceppi di plasmodio capaci di infettare le zanzare italiane. In questo contesto, è estremamente importante mantenere una continua sorveglianza epidemiologica, attuata sia attraverso il monitoraggio dei vettori sia attraverso la caratterizzazione degli isolati plasmodiali circolanti nel nostro paese.

BIBLIOGRAFIA

- Accelrys Inc** (2003). Discovery Studio Gene Online Help. San Diego: Accelrys Inc.
- Adiyodi KG e Adiyodi RG** (1975) Morphology and cytology of the accessory sex glands in invertebrates. *Int Rev Cytol* 43:353–398.
- Adiyodi KG e Adiyodi RG** (1983). Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. III. Accessory Sex Glands. John Wiley & Sons, New York.
- Aikawa M** (1988). Morphological changes in erythrocytes induced by malarial parasites. *Biol Cell*;64(2):173-81.
- Aitken THG e Casini GU** (1966). Sardinia after malaria eradication. WHO/Mal, 66.546
- Angeli L, Vallorani R, Messeri G, Crisci A, Piani F, Costantini R, Ferrari R, Innocenti L, Costanza L** (2009). Modelli Statistici e analisi di tipo GIS per la previsione categoriale su base meteorologica e la valutazione del rischio strutturale di insetti Ceratopogonidi (*Leptoconops irritans* e *kerteszi*) e zanzara Anophele nelle Province di Grosseto e Viterbo. Ed. Fondazione per il Clima e la Sostenibilità: 70pp.
- Angelucci A** (1955). Tavole sinottiche sugli anofelini italiani. ACIS. Monogr Annali di Sanità Pubblica.
- Arnoldus-Huyzendveld A** (2005). Alcuni aspetti dell'ambiente olocenico del Parco Regionale della Maremma. Eds Università di Siena, Polo Universitario di Grosseto, 20 p.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S, Scicluna MT** (2002). West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis*;8(12):1372-8.
- Ayala FJ, Escalante AA, Rich SM** (1999). Evolution of *Plasmodium* and the recent origin of the world populations of *Plasmodium falciparum*. *Parassitologia*; 41(1-3):55-68..
- Baldari M, Tamburro A, Sabatinelli G, Romi R, Severini C, Cuccagna P, Fiorilli G, Allegri MP, Buriani C, Toti M** (1998). Introduced malaria in Maremma, Italy, decades after eradication. *The Lancet*, 351:1246-1248.
- Bellotti P, Caputo C, Davoli L, Evangelista S, Valeri P** (1999). Lineamenti morfologici e sedimentologici della piana deltizia del Fiume Ombrone (Toscana Meridionale). *Boll. Soc. Geol. It.*, 118, 141-148.
- Bettini S, Gradoni L, Cocchi M, Tamburro A** (1978). Rice culture and *Anopheles labranchiae* in Central Italy. WHO/Mal, 78.897.
- Bietolini S, Candura F, Coluzzi M** (2006). Spatial and long term temporal distribution of the *Anopheles maculipennis* complex species in Italy. *Parassitologia*, 48(4):581-608.

- Boccolini D, Di Luca M, Romi R** (2004). Preliminary findings on the distribution of the malaria vector *Anopheles labranchiae* in central Italy inferred by ITS2 analysis. XXIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Vietri sul Mare (SA), 9-12 giugno. Parassitologia, 46 (Suppl. 1): 206.
- Boccolini D, Romi R, D'Amato S, Pompa MG, Majori G** (2007). Sorveglianza della malaria in Italia e analisi della casistica del quinquennio 2002-2006. Giornale Italiano di Medicina Tropicale, 12 (1-4):5-12.
- Boccolini D, Di Luca M, Toma L, Severini F, VanGemert G, Mancini Barbieri F, Massa A, Luty A, Romi R** (2008). Feeding preferences and vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Tuscany), a former hyperendemic area in Central Italy. XXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008. Parassitologia [abstract], 50(Suppl.1-2):137.
- Boccolini D, Toma L, Di Luca M, Severini F, Massa A, Mancini Barbieri F, Pontuale G, Cocchi M, Tamburro A, Romi R** (2009). Influence of anthropogenic changes on potential malaria vector, *Anopheles labranchiae*, in Maremma Plain (Tuscany), Italy. 5th European Mosquito Control Association Workshop, Torino, 9-13 marzo 2009.
- Boccolini D, Thiéry I, Di Luca M, Toma L, Landier A, Massa A, Severini F, Bourgouin C, Romi R** (submitted). Preliminary data on vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Grosseto, Tuscany), a former malaria hyperendemic area in Central Italy. International Conference of EDEN, Montpellier 10-13 maggio 2010.
- Bongiorno G, Habluetzel A, Khoury C, Maroli M** (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in Central Italy. Acta Trop, 88(2):109-116.
- Bruce-Chwatt LJ** (1985). Essential Malariology, William Heinemann Medical Books, London, p. 172.
- Bullini LM e Coluzzi M** (1973). Electrophoretic studies on gene-enzyme systems in mosquitoes (Diptera, Culicidae), Parassitologia, 15:221-248.
- Canaperia GA e Patrissi T** (1948). La malaria in Italia nel periodo bellico e post-bellico. Riv Malariol, 27:1-28.
- Cancrini G** (1996). Parassitologia medica illustrata. Eds. Lombardo, 429 p.
- Cancrini G, Romi R, Gabrielli S, Toma L, Di Paolo M, Scaramozzino P** (2003a). First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 17(4):448-51.

- Cancrini G, Frangipane di Regalbono A, Ricci I, Tessarin C, Gabrielli S, Pietrobelli M** (2003b). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol.*, 118(3-4):195-202.
- Cancrini G, Scaramozzino P, Gabrielli S, Di Paolo M, Toma L, Romi R** (2007). *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *J Med Entomol.*;44(6):1064-6.
- Cefalù M e Gullotta A.** (1959). Su un episodio epidemico occorso in fase di Eradicazione della malaria in Sicilia. *Riv Malariol*, 38:45-70.
- Chretien JP, Anyamba A, Bedno S, Breiman R, Njuguna C, Sang S, Seron K, Powers A, Ball M, Onyango C, Small J, Tucker CJ, Linthicum KJ** (2007). Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. *Am J Trop Med Hyg*; 76:405–407.
- Collins FH e Paskewitz SM** (1996). A review of the use of ribosomal DNA (rDNA) to differentiate among cryptic *Anopheles* species. *Insect Mol Biol*, 5:1-9.
- Coluzzi A e Finizio E** (1966). Il problema degli insetti ematofagi nella zona litoranea della provincia di Grosseto. *Riv Malariol*, 45:137-145.
- Coluzzi M e Coluzzi A** (1980). Rischio di una ripresa della trasmissione della Malaria in Calabria e problemi connessi al controllo dei vettori. *Rivista di parassitologia*. 41 (Suppl.):117-125.
- Confalonieri U, Menne B, Akhtar R, Ebi KL, Hauengue M, Kovats RS, Revich B, Woodward A** (2007). Human health. *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, M.L. Parry, O.F. Canziani, J.P. Palutikof, P.J. van der Linden and C.E. Hanson, Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK, 391-431.
- Conway DJ, Fanello C, Lloyd JM, Al-Joubori BM, Baloch AH, Somanath SD, Roper C, Oduola AM, Mulder B, Pova MM, Singh B, Thomas AW** (2000). Origin of *Plasmodium falciparum* malaria is traced by mitochondrial DNA. *Mol Biochem Parasitol.*;111(1):163-71.
- Cox-Singh J e Singh B.** (2008). Knowlesi malaria: newly emergent and of public health importance? *Trends in Parasitology*, 24(9): 406-410.
- Craig A, Kyes S, Ranson H, Hemingway J** (2003). Malaria parasite and vector genomes: partners in crime. *Trends Parasitol.*; 19(8):356-62.
- Davey KG** (1985) The female reproductive tract. In *Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology* (Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I., eds), pp. 15–36. Pergamon Press, Oxford.
- Degrugillier ME and Leopold RA** (1976) Ultrastructure of sperm penetration of house fly eggs. *J Ultrastruct Res* 56: 312–325.
- DesertNet** (2005). <http://www.case.ibimet.cnr.it/desertnet/>

- Detinova TS** (1962). Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. Monogr Ser WHO, 47:13-191.
- Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Mancini Barbieri F, Massa A, Romi R** (2009). A two-year entomological study of potential malaria vectors in Central Italy. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 9(6):703-711.
- F.A.O. - Unesco** (1974). Soil Map of the World 1:5.000.000. Volume 1, Legend, Unesco, Paris.
- Fausto AM, Khoury C, Maroli M, Mazzini M** (1997). Ultrastructure of reproductive accessory glands in the female sand fly *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera: Psychodidae). Int J Insect Morph Embryol, , 26: 121–128
- Gage KL, Burkot TR, Eisen RJ, Hayes EB** (2008). Climate and vectorborne diseases. Am J Prev Med;35:436 –50.
- Gatton ML, Kay BH, Ryan PA** (2005). Environmental predictors of Ross River virus disease outbreaks in Queensland, Australia. Am J Trop Med Hyg. 2005 Jun;72(6):792-9.
- Gillott C** (2003). Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. Annu Rev Entomol. 2003;48:163-84.
- Greenwood BM, Bojang K, Whitty CJ, Targett GA** (2005). Malaria..Lancet 365 (9469): 1487–1498.
- Hackett LW** (1937). Malaria in Europe. An ecological study. Oxford University Press, London: H.Milford.
- Happ GM** (1992). Maturation of the male reproductive system and its endocrine regulation. Annu Rev Entomol.;37:303-20..
- Hatefi Y** (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. Annu. Rev. Biochem. 54:1015-1069.
- Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O’Leary DR, Campbell GL** (2005). Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. Emerg Infect Dis;11:1167–73.
- Innocenti L e Pranzini E** (1993). Geomorphological evolution and sedimentology of the Ombrone River delta (Italy). J. Coastal Res. 9, 481–493.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC** (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. Journal of Molecular Evolution 32, 128-144.
- Jetten TH, Martens WJM, Takken W** (1996). Model simulations to estimate malaria risk under climate change. J Med Entomol, 33:361-371.
- Jones JC e Wheeler RE** (1965). Studies on spermathecal filling in *Aedes aegypti* (Linnaeus). I. Description. Biol. Bull. 129: 134-150.

- Kampen H** (2005). Integration of *Anopheles beklemishevi* (Diptera: Culicidae) in a PCR assay diagnostic for palaearctic *Anopheles maculipennis* sibling species. *Parasitology Research*; 97(2):113-117.
- Karnovsky MJ** (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27,137A-138A.
- Kaulenas MS** (1991). Insect accessory reproductive structures. In *Zoophysiology*, eds S. D. Bradshaw, W. Burggren and H. C. Heller, Vol. 31, pp. 1-224. Springer-Verlag, Berlin.
- Kent RJ e Norris DE** (2005). Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome b. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73(2): 336-342.
- Kuhn KG, Campbell-Lendrum DH, Davies CR** (2002). A continental risk map for malaria mosquito (Diptera: Culicidae) vectors in Europe. *J Med Entomol*, 39 (4): 621-630.
- Lazzara A, Morante V, Priolo A** (1967). Microfocolaio residuo di infezione malarica in provincia di Palermo. *Ann Sanità Pubblica*, 28:725-741.
- Levine RS, Peterson AT, Benedict MQ** (2004). Distribution of members of *Anopheles quadrimaculatus* say s.l. (Diptera: Culicidae) and implications for their roles in malaria transmission in the United States. *J Med Entomol*;41:607–13.
- MacDonald G** (1957). The epidemiology and control of malaria. London: Oxford University Press.
- Majori G, Maroli M, Bettini S, Pierdominici G** (1970). Osservazioni sull'anofelismo residuo nel Grossetano. *Riv Parassitol*, 31:147-154.
- Marinucci M, Romi R, Mancini P, Di Luca M, Severini C** (1999). Phylogenetic relationship of seven Palearctic members of the *maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) inferred from ITS2 analysis. *Insect Mol Biol*, 8:469-480.
- Missiroli A** (1948). *Anopheles* control in the Mediterranean area. *Proc 4th Int Congr on Trop Med and Malar*, 2:1566-1576.
- Missiroli L, Hackett W, Martini E** (1933). Le razze di *Anopheles maculipennis* e la loro importanza nella distribuzione della malaria in alcune regioni d'Europa. *Riv Malariol*, 1:1-56.
- Molineaux L e Gramiccia G** (1980). Le Projet Garki. Geneva: World Health Organization;.
- Montath TP** (2004). Yellow fever vaccine. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit PS, eds. *Vaccines*. Philadelphia: Saunders.
- Murray J** (2002). *Mathematical Biology. I: An introduction*. 3rd edition. New York: Springer.
- Noirot C e Quennedey A** (1974). Fine structure of insect epidermal glands. *Annu. Rev. Entomol.* 19, 61-80.

- O'Leary DR, Marfin AA, Montgomery SP, Kipp AM, Lehman JA, Biggerstaff BJ, Elko VL, Collins PD, Jones JE, Campbell GL** (2004). The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002. *Vector Borne Zoonotic Dis*;4:61–70.
- Pherez FM** (2007). Factors affecting the emergence and prevalence of vector borne infections (VBI) and the role of vertical transmission (VT). *J Vector Borne Dis*;44:157– 63.
- Pontes RJ, Freeman J, Oliveira-Lima JW, Hodgson JC, Spielman A** (2000). Vector densities that potentiate dengue outbreaks in a Brazilian city. *Am J Trop Med Hyg*;62:378–83.
- Proft J, Majer WA, Jampen H** (1999). Identification of six sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex (Diptera: Culicidae) by a polymerase chain reaction assay. *Parasitol Res*, 85:837-843.
- Raffaele G** (1964). Note sull'eradicazione della malaria in Italia. *Riv Malariol*, 43(1-2): 1-27.
- Ramsdale CD e Coluzzi M** (1975). Studies on the infectivity of tropical African strains of *Plasmodium falciparum* to some southern European vectors of malaria. *Parassitologia* 17, 39-48.
- Reeves WC, Hardy JL, Reisen WK, Milby MM** (1994). Potential effect of global warming on mosquito-borne arboviruses. *J Med Entomol*;31:323–32.
- Regione Toscana** (1998). Regolamento speciale per la coltivazione del riso in sommersione nella provincia di Grosseto. Deliberazione G.R. n. 1375 del 16.11.1998.
- Reisen WK, Fang Y, Martinez VM** (2006). Effects of temperature on the transmission of West Nile Virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*; 43:309 –17.
- Reiter P** (2001). Climate change and mosquito-borne disease. *Environ Health Perspect*;109(1S):141–61.
- Reiter P** (2008). Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. *Malaria Journal*, 7(Suppl 1):S3
- Reiter P, Lathrop S, Bunning M, Biggerstaff B, Singer D, Tiwari T, Baber L, Amador M, Thirion J, Hayes J, Seca C, Mendez J, Ramirez B, Robinson J, Rawlings J, Vorndam V, Waterman S, Gubler D, Clark G, Hayes E** (2003). Texas lifestyle limits transmission of dengue virus. *Emerg Infect Dis*;9:86 –9.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori G, Cassone A** (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*.;370(9602):1840-1846.
- Rioux JA** (1958). Les Culicidés du “Midi” Méditerranéen. Volume 35. Paris, France: Editions Paul Lechavalier;.

- Rizzo C, Vescio F, Declich S, Finarelli AC, Macini P, Mattivi A, Rossini G, Piovesan C, Barzon L, Pal G, Gobbi F, Macchi L, Pavan A, Magurano F, Ciufolini MG, Nicoletti L, Salmaso S, Rezza G** (2009). West Nile virus transmission with human cases in Italy, August - September 2009. *Euro Surveill.*;14(40). pii:19353.
- Rogers DJ e Randolph SE** (2000). The global spread of malaria in a future, warmer world. *Science*, 8;289:1763-1766.
- Rogers DJ e Randolph SE** (2006). Climate change and vector-borne diseases. *Adv Parasitol*; 62:345– 81.
- Romi R** (1999). *Anopheles labranchiae*, an important vector in Italy, and other potential malaria vectors in Southern Europe. *European Mosquito Bulletin*, 4:8-10.
- Romi R, Severini C, Cocchi M, Tamburro A, Menichetti D, Pierdominici G, Majori G** (1992). *Anopheles* in Italy: distribution on rice lands in the provinces of Grosseto and Siena. *Ann Ist Super Sanità*, 28(4):527-531.
- Romi R, Pontuale G, Sabatinelli G** (1997a). Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli stadi preimaginali (Diptera, Culicidae). *Fragmenta Entomologica*, 29:1-141.
- Romi R, Pierdominici G, Severini C, Tamburro A, Cocchi M, Menichetti D, Pili E, Marchi A** (1997b). Status of malaria vectors in Italy. *J Med Entomol*, 34(3):263-271.
- Romi R., Boccolini D., Di Luca M., La Rosa G., Marinucci M** (2000). Identification of the sibling species of the *Anopheles maculipennis* complex by heteroduplex analysis. *Insect Molecular Biology*, 9(5): 509-513.
- Romi R, Sabatinelli G, Majori G.**(2001). Could Malaria Reappear in Italy? *Emerg Infect Dis*, 7(6):915-919.
- Romi R, Boccolini D, Majori G** (2002). La Malaria in Italia nel 2000-2001. *Inserto BEN-Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità*. 15 (7-8).
- Romi R, Pontuale G, Ciufolini MG, Fiorentini G, Marchi A, Nicoletti L, Cocchi M, Tamburro A** (2004). Potential vectors of West Nile virus following an equine disease outbreak in Italy. *Med Vet Entomol*,18(1):14-9.
- Romi R, Boccolini D, D'Amato S, Pompa MG, Majori G** (2006). Imported malaria in Italy (2000-2005) and risk assessment of malaria resurgence in a former endemic area of central Italy. XXIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Messina, 21-24 giugno Parassitologia [abstract], 48:324.
- Rosay B** (1968). Accessory glands of female *Culex pipiens quinquefasciatus* Say and autogenous *Culex pipiens pipiens* L. (Diptera Culicidae): Appearance and behavior in relation to oogenesis. *J. Med. Entomol.* 5: 478-482.

- Rosetto M, Belardinelli M, Fausto AM, Marchini D, Bongiorno G, Maroli M, Mazzini M** (2003). A mammalian-like lipase gene is expressed in the female reproductive accessory glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera, Psychodidae) *Insect Molecular Biology*, 12(5), 501–508
- Rossignol PA, McIver SB, Goldenberg M** (1977). Accessory reproductive gland of female *Aedes aegypti*: structure and relationship to oogenesis. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 70:279-281.
- Rossini G, Cavrini F, Pierro A, Macini P, Finarelli A, Po C, Peroni G, Di Caro A, Capobianchi M, Nicoletti L, Landini M, Sambri V** (2008). First human case of West Nile virus neuroinvasive infection in Italy, September 2008 - case report. *Euro Surveill.* 9;13(41). pii: 19002.
- Sautet J e Quilici R** (1971). A propos de quelques cas de paludisme autochtone contractés en France pendant l'été. *Presse Médicale*;79:524. 25.
- Sevink J, Beemster T, van Stiphout T** (1986). Soil Survey and Land Evaluation of the Grosseto area; rapporto interno dell'Università di Amsterdam per la Regione Toscana, cartografia in scala 1:50.000.
- Shope R** (1991). Global climate change and infectious diseases. *Environ Health Perspect*;96:171–4.
- Soper FL, Knipe FW, Casini G, Riehl LA, Rubino A** (1947). Reduction of *Anopheles* density effected by the preseason spraying of building interiors with DDT in kerosene, at Castel Volturno, Italy, in 1944-1945 and in the Tiber Delta in 1945. *Am J Trop Med Hyg*, 27:177-200.
- Sutherst RW** (2004). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*; 17:136 –73.
- Tran A, Ponçon N, Toty C, Linard C, Guis H, Ferré JB, Lo Seen D, Roger F, De La Rocque S, Fontenille D, Baldet T** (2008). Using remote sensing to map larval and adult populations of *Anopheles hyrcanus* (Diptera: Culicidae) a potential malaria vector in Southern France. *International Journal Of Health Geographics* 7:9.
- White GB.**(1978). Systematic reappraisal of the *Anopheles maculipennis* complex. *Mosq Syst*, 10: 3-44.
- White NJ** (2008). *Plasmodium knowlesi*: The Fifth Human Malaria Parasite. *Clinical Infectious Diseases*; 46:172–3
- WHO** (2007). Environment and health risks from climate change and variability in Italy. Copenhagen: World Health Organization, 106 pp.
- World Meteorological Organization** http://www.wmo.int/pages/index_en.html

Zahar AR (1990). The WHO European region and the two Eastern Mediterranean Region. Applied field studies. In Vector bionomics in the epidemiology and control of malaria. Part II. WHO/VBC/90.2, 2:226pp.

Zulueta J de, Ramsdale C, Coluzzi M (1975). Receptivity to malaria in Europe. Bulletin World Health Organization, 52: 109111

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare la Prof.ssa Anna Maria Fausto per avermi concesso l'opportunità di intraprendere questo percorso formativo.

Un ringraziamento speciale va ai miei colleghi del Dipartimento MIPI dell'Istituto Superiore di Sanità per i loro preziosi consigli e la loro disponibilità: il Dr. Luciano Toma, la Dr.ssa Michela Menegon, il Dr. Francesco Severini, la Dr.ssa Daniela Boccolini, Antonio Massa, Francesca Mancini e il Dr. Roberto Romi.

Desidero, inoltre, ringraziare tutti coloro che in un modo o nell'altro hanno condiviso con me questa esperienza di vita e di lavoro, e in particolare la Dr.ssa Gabriella Gambellini, Valentina Laghezza Masci e il Dr. Cristiano Papeschi dell'Università degli Studi della Tuscia; il Dr. Roberto Vallorani, il Dr. Luca Angeli e il Dr. Gianni Messeri del gruppo LaMMA; il Dr. Angelo Tamburro, il Dr. Maurizio Cocchi, la Dr.ssa Irene Raffaelli e il Dr. Giorgio Pontuale dell'Unità di Zoologia Ambientale dell'ASL 9 di Grosseto.

**Naturalmente un grazie speciale a Simona e ai miei splendidi bimbi,
Stefano e Matteo.**

ELENCO DELLE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE

Articoli su riviste internazionali

Di Luca M, Romi R, Severini F, Toma L, Musumeci M, Fausto AM, Mazzini M, Gambellini G, Musumeci S (2007). High levels of human chitotriosidase hinder the formation of peritrophic membrane in anopheline vectors. *Parasitology Research*, 100(5):1033-1039.

Romi R, Toma L, Severini F, **Di Luca M** (2009). 20 years of presence of *Aedes albopictus* in Italy: from the annoying pest mosquito to the real diseases vector. *European Infectious Disease*. 2(2):98-101.

Di Luca M, Boccolini D, Severini F, Toma L, Mancini Barbieri F, Massa A, Romi R (2009). A two-year entomological study of potential malaria vectors in Central Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 9(6):703-711.

Articoli su riviste nazionali

Severini F, **Di Luca M**, Toma L, Romi R (2008). *Aedes albopictus* in Rome: results and perspectives after 10 years of monitoring. *Parassitologia* 50: 121-123.

Romi R, **Di Luca M**, Severini F, Toma L, Majori G (2008). Linee guida per il controllo di *Aedes albopictus* e di altri Culicidi potenziali vettori di arbovirus in Italia. *Giornale Italiano di Medicina Tropicale*: 13(Suppl), 41 pp.

Romi R, Toma L, Severini F, **Di Luca M**, Boccolini D, Ciufolini MG, Nicoletti L, Majori G. (2009). Linee guida per il controllo di Culicidi potenziali vettori di arbovirus in Italia. Roma: Istituto Superiore di Sanità;. (Rapporti ISTISAN 09/11). 52 p.

Severini F, Toma L, **Di Luca M**, Romi R (submitted). Le zanzare italiane: generalità e identificazione degli adulti (Diptera: Culicidae). *Fragmenta entomologica*, 41(2):p.

Comunicazioni a congressi internazionali

Ponzi M, Curr G, **Di Luca M**, Romi R, Picci L, Pace T (2008). Regulation of the expression and subcellular localization of sep family members in *Plasmodium berghei*. Fourth Annual BioMalPar Conference on the Biology and Pathology of the Malaria Parasite, EMBL Germany, Heidelberg, 14-16 aprile 2008:17.

Boccolini D, Toma L, **Di Luca M**, Severini F, Massa A, Mancini Barbieri F, Pontuale G, Cocchi M, Tamburro A, Romi R (2009). Influence of anthropogenic changes on potential malaria vector, *Anopheles labranchiae*, in Maremma Plain (Tuscany), Italy. 5th European Mosquito Control Association Workshop, Torino, 9-13 marzo 2009.

Di Luca M (submitted). A Multiplex-PCR to identify Vertebrate hosts from mosquito bloodmeals. International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Di Luca M, Laghezza Masci V, Papeschi C, Romi R, Fausto AM (submitted). Potential malaria anopheline vectors of North Lazio (Central Italy). International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Boccolini D, Thiéry I, **Di Luca M**, Toma L, Landier A, Massa A, Severini F, Bourgouin C, Romi R. (submitted). Preliminary data on vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Grosseto, Tuscany), a former malaria hyperendemic area in Central Italy. International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Angeli L, Vallorani R, Boccolini D, Costantini R, Messeri G, Toma L, Severini F, Tran A, Romi R, **Di Luca M**. (submitted). Environmental and climatic analysis for mapping the potential malaria vector, *Anopheles labranchiae* (Diptera: Culicidae) in Maremma Plain. International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Fausto AM, Gambellini G, Laghezza Masci V, **Di Luca M**. (submitted). Fine structure of the female reproductive accessory gland and the spermatheca in anopheline mosquitoes (Diptera, Culicidae). International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Romi R, Boccolini D, **Di Luca M**, Severini F, Toma L. (submitted). Risk assessment of malaria reintroduction in Italy. Evaluation of the malariogenic potential of Maremma Plain (Tuscany)

and of the vectorial capacity of *Anopheles labranchiae*. International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Vicente JL, Sousa CA, Silva TL, Alves R, Toty C, Barre H, Falcuta E, Latorre JM, Bargues MD, Mas-Coma S, Boccolini D, **Di Luca M**, Toma L, Romi R, Alten B, Demirci B, Caglar SS, Ozer N, Nicolescu G, Rosário VE, Fontenille F, Pinto J, (submitted). Population structure of the European malaria vector *Anopheles atroparvus*. International Conference EDEN, Montpellier, France, 10-12 maggio 2010.

Comunicazioni a congressi nazionali

Di Luca M, Toma L, Severini F, Boccolini D, Romi R (2007). Studio della fauna anofelica della Maremma: due anni di attività nell'ambito del sottoprogetto europeo EDEN-Malaria. XXI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Campobasso, 11-16 giugno 2007: 306.

Toma L, Menegon M, **Di Luca M**, Romi R Severini C (2007). Resistenza di popolazioni italiane di *Culex pipiens* ed *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) agli insetticidi fosfororganici. XXI Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Campobasso, 11-16 giugno 2007: 324.

Boccolini D, **Di Luca M**, Toma L, Severini F, VanGemert G, Mancini Barbieri F, Massa A, Luty A, Romi R (2008). Feeding preferences and vector competence of *Anopheles labranchiae* from Maremma Plain (Tuscany), a former hyperendemic area in Central Italy. XXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008. Parassitologia, 50(Suppl.1-2):137.

Toma L Boccolini D, **Di Luca M**, Mancini Barbieri F, Massa A, Severini F, Zamburlini R, Pinna G, Pontuale G, Torina A, Romi R (2008). A further contribution about distribution and abundance of potential malaria vectors, in some selected sites of the Italian Regions. XXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008. Parassitologia, 50(Suppl.1-2):113.

Di Luca M, Laghezza Masci V, Papeschi C, Romi R, Fausto AM (2008). A contribution to the knowledge of the Anophelines of Northern Latium with particular attention to the potential malaria vectors. XXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Parassitologia, Pisa, 18-21 giugno 2008. Parassitologia, 50(Suppl.1-2):112.

Boccolini D, **Di Luca M**, Toma L, Severini F, Massa A, Mancini Barbieri F, Tamburro A, Pontuale G, Cocchi M, Romi R (2009). Ulteriori indagini sulla presenza di specie del complesso *Anopheles maculipennis* nella Maremma toscana. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Ancona, 15-18 giugno 2009: 239.

Di Luca M, Laghezza Masci V, Papeschi C, Romi R, Fausto A.M (2009). Caratterizzazione della fauna culicidica (Diptera: Culicidae) della Maremma laziale. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Ancona, 15-18 giugno 2009: 256.

Severini F, Toma L, **Di Luca M**, Romi R, Majori G (2009). Chiavi per l'identificazione morfologica degli adulti delle zanzare (Diptera: Culicidae) italiane. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Ancona, 15-18 giugno 2009: 265.

Toma L, Severini F, **Di Luca M**, Cipriani M, Goffredo M, Lelli R, Romi R (2009). Dati entomologici su alcune specie di culicidi (Diptera: Culicidae) poco diffuse in Italia. XXII Congresso Nazionale Italiano di Entomologia, Ancona, 15-18 giugno 2009: 266.